

Vol. 35, No. 1.

January, 1942.

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

**SAMURO KAKIUCHI**

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$6.00 per volume.

QP  
501  
J67





# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

**SAMURO KAKIUCHI**

**Professor in the Tokyo Imperial University**

VOLUME 35

TOKYO

1942

COPYRIGHT 1942

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY



## CONTENTS TO VOLUME 35.

	Page
SUEYOSHI, Yuji und Kikusuke TOOYAMA. Über die Zuckerbildung aus Fett im Tierkörper. I. Mitteilung. Über Leberglykogen bei kohlehydratfreier Fettdiät .....	1
TOOYAMA, Kikusuke. Über die Zuckerbildung aus Fett im Tierkörper. II. Mitteilung. Über die B <sub>1</sub> -Avitaminose bei kohlehydratfreier Fettdiät .....	9
FUJIMURA, Shiro. Further studies on the organ specificity .....	25
HORIKOSHI, Katsumi. Studien über die Carbohydase. 5. Mitteilung. Über $\beta$ -Glukosidase und $\beta$ -Galaktosidase von Taka- und Emulsin-Typus .....	39
KOYANAGI, Jokiehi. Über die Ablagerung des Chaulmoograöls in den Organen .....	61
HUKASAKO, Tetuo. Studium über das Blutphosphatid. I. Mitteilung. Über die Beziehung zwischen den Serumphosphatiden und den Fraktionen des Serumeiweisses .....	67
FUJITA, Akiji und Danji MATSUKAWA. Bemerkungen über die kolorimetrische Bestimmung des Vitamin B <sub>1</sub> in tierischen und pflanzlichen Geweben .....	79
FUJITA, Akiji und Danji MATSUKAWA. Über die Verteilung des Vitamin B <sub>1</sub> in tierischen und pflanzlichen Geweben. I. ....	89
UTSUNOMIYA, Takefumi. Studies on carboxypeptidase .....	103
AJISAKA, Masanobu. Über die Bestimmung des Provitamin A. II. Bestimmung des Kryptoxanthins .....	119
KOYANAGI, Jokiehi. Über den Stoffwechsel der Tiere bei der Chaulmoograölinjektion. Über den Einfluss des Chaulmoograöls auf die Phosphorverbindungen im Blute .....	133
IWAKI, Kanzi. Über das Schicksal der Trioxy-bufosterocholensäure im Meerschweinchenorganismus .....	139
IWAKI, Kanzi. Über das Schicksal der Trioxy-isosterocholensäure im Kaninchenorganismus .....	149
KANEMITU, Tutomu. Über die Alligatorschildkrötengalle. III. Über die chemische Konstitution des Trioxy-sferocholensäurelaktons .....	155
IV. Über den Abbau des Trioxy-sterocholensäurelaktons bis zur Bisnorcholsäure, 3.7.12-Trioxy-pregnan-20-on und 3.7.12-Trioxyäthiocholensäure .....	173
SEIKI, Yoshinori. Über racemische Isomere des Leucyl-isoserins .....	187
OZAWA, Ryozi. Über den Stoffwechsel des mit Chaulmoograöl injizierten Tieres. Über ihre Wirkung auf den Blutzucker des Kaninchens .....	193
KANAZAWA, Koichi. Über den Stoffwechsel des mit Chaulmoograöl injizierten Tieres. Über ihre Wirkung auf die Menge der Fraktionen des Eiweisses im Blutplasma des Kaninchens .....	203
AMANO, Masaharu. Über den Stoffwechsel bei niedriger Temperatur. I. Mitteilung: Über den Zusammenhang zwischen niedriger Temperatur und dem Serumkephalin .....	219

IWAKI, Kanji. Über das Schicksal des Pentaoxy-bufostans im Meer-schweinchenorganismus .....	225
SUGANAMI, Takao u. Kazumi YAMASAKI. Über die Alligatorschildkrötengalle II. Trioxy-ster- und Trioxy-isostero-cholansäurelaktone .....	233
SAITO, Hisasi. Studies on tyrosinase. VII. The action of the potatoe tyrosinase on trihydric phenols .....	243
FUKE, Fuzio. Studien über Polysaccharide aus pathogenen Pilzen. III. Mitteilung .....	259
IV. Mitteilung .....	263
AJISAKA, Masanobu, Isamu NUMATA, Keizaburo DOHI u. Sasuke OKUBO. Über die Änderung des Gehalts an Vitamin A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> und C in Gemüsen und Obst während der Aufbewahrung .....	271
TOKUNAGA, Kazuo. Beitrag zur Kenntnis der Takadiastase .....	281
KUGA, Tori. Über die katalytische Decarboxylierung der $\beta$ -Ketocarbon-säure .....	293
FUJIMURA, Shiro. Studies on the heterogenetic antigen. III. Studies on the antibody producing substance .....	307
OKUGAWA, Yuzo. Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen B-Vitamin und Kohlehydratstoffwechsel .....	325
ISIMOTO, Kiyomatu. Über einen Inhibitor der Glyoxalase .....	351
SHIBUYA, Shinichi. Biochemical studies on guanidine-bodies. I. Reaction between ammonia and amino compound in the presence of charcoal .....	379
YAMASAKI, Seiko. Biochemical studies on the rice of Chosen. III. On the fat of the rice-bran .....	393
KANEMITU, Tutomu. Über eine isomere Cholsäure, Heterocholsäure aus der Alligatorschildkrötengalle .....	409
KANEMITU, Tutomu. Bildung von $\alpha$ - und $\beta$ -3-Oxy-7-ketocholansäure aus Dehydrochenodesoxycholsäure im Krötenorganismus .....	413
DOHI, Keizaburo. Über die Verteilung des Vitamin B <sub>1</sub> in tierischen und pflanzlichen Geweben. II. ....	419
III. ....	431



# ÜBER DIE ZUCKERBILDUNG AUS FETT IM TIERKÖRPER.

## I. Mitteilung.

### Über Leberglykogen bei kohlehydratfreier Fettdiät

VON

YUJI SUEYOSHI UND KIKUSUKE TOOYAMA.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1941)

## I. EINLEITUNG.

Eines der umstrittensten Probleme der Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels ist die Frage der Zuckerbildung aus Fett. Diese Frage ist schon früher von vielen Forschern bearbeitet worden. Die meisten Untersuchungsmethoden lagen hierbei in der Bestimmung des resp. Quotienten, von D:N des Urins und des Leberglykogens.

Kroh und Lindhard (1920) nahmen bei Tieren, die unter Fettdiät standen, die Bestimmung des resp. Quotienten vor und stellten fest, dass der in Ruhe grosse resp. Quotient bei der Bewegung kleiner wird; sie erklärten dies damit, dass zu dieser Zeit das Kohlehydrat vom Fett gebildet wurde. Gregg (1931) verabreichte den Ratten Butter und fand bei der Bestimmung des resp. Quotienten, dass das Kohlehydrat nicht vom Fett, sondern vom Glycerin gebildet wird. Hawley, Johnson und Mulin (1933) untersuchten ebenfalls bei Fettdiät den resp. Quotienten und fanden ihn in 1 von 3 Fällen 0,6, in den übrigen über 0,7. Die mit obigen resp. Quotienten ermittelten Ergebnisse sind nicht hinreichend genug, die Bildung des Zuckers aus Fett anzuerkennen.

Es gibt eine Anzahl von Autoren, welche an Tieren, bei denen durch Phlorhizin eine Diabetes erzeugt wurde und denen danach Fett verabreicht wurde, D:N des Urins bestimmt und die Bildung

des Zuckers aus Fett untersucht haben (Mering (1889), Moritz u. Prausnitz (1890), Ringer u. Lusk (1910), Rosenfeld (1912) und Takao (1926)), doch konnte von diesen Autoren die Bildung des Zuckers aus Fett nicht nachgewiesen werden. Ascher und Calvo-Criado (1925) nahmen an Ratten die D:N-Bestimmung bei Fettdarreichung vor und betonten, dass nach dem Ergebnis das Kohlenhydrat aus Fett gebildet werden könne; da sich aber bei genauer Betrachtung dieser Ergebnisse eine starke Schwankung von D:N gezeigt habe, sei es unmöglich, nur mit diesen Ergebnissen allein die Bildung des Kohlehydrats aus Fett anzuerkennen.

Chaikoff (1927) gelangte in der D:N-Bestimmung an fettleibigen sowie mageren Tieren zu dem Ergebnis, dass bei den ersteren D:N grösser ist; nach ihm werde infolgedessen das Kohlehydrat aus Fett gebildet. Rapport (1930) hat die Annahme von Chaikoff widerlegt; nach seiner Ansicht ist bei fettleibigen Tieren wegen der guten Ernährung das Glykogen in der Leber in reichlicher Menge vorhanden, und somit D:N grösser.

Jost (1931) hat die normale Hundeleber und die Phlorhizin-Hundeleber mit Blut durchblutet, dem Phosphatid zugesetzt war und darauf D:N des Blutes, den resp. Quotienten und die Reduktionskraft untersucht. Er hat dabei gefunden, dass nach 20 Minuten Durchblutung das Phosphatid zu 60% zersetzt wird, zu gleicher Zeit die Sauerstoffspeicherung zunimmt, der resp. Quotient eine Abnahme und die Reduktionskraft eine Zunahme erfährt. Aus obigen Ergebnissen hat er geschlossen, dass das Kohlehydrat aus Phosphatid gebildet wird. Diese Ergebnisse wurden später von Mitchell (1933) diskutiert; nach ihm ist bei der Bestimmung des Leberglykogens gemäss der Pflügerschen Methode ein kleinerer Wert als der tatsächliche zu erhalten. Jost hat nach diese Methode gemessen und sich geäussert, dass die Versuche bei geringer Glykogenmenge in der Leber vorgenommen wurden. Doch nach Mitchell scheint das Leberglykogen dabei in noch beträchtlicher Menge übrig zu bleiben. Daher hat Jost nach der Meinung von Mitchell bei der Leber mit Glykogen in beträchtlicher Menge die Durchblutung mit Phosphatid-Blut durchgeführt und dadurch die Mobilisation des Glykogens hervorgerufen und die Zunahme



der Reduktionskraft des Blutes beobachtet. Nach der Beurteilung von Toenniesen u.a. (1938) ergibt der von Jost bestimmte resp. Quotient einen niedrigen Wert, aber beim Überblick seiner Ergebnisse zeigt der resp. Quotient bei einigen Fällen vor der Durchblutung schon einen sehr niedrigen Wert, was anzeige, dass der Gasaustausch der Leber zu dieser Zeit nicht normal erfolgt.

Unter den vielen Forschern, welche die Frage der Zunahme des Glykogens in der Leber nach der Darreichung des Fettes an Tiere untersuchten, haben Takao (1926), Body, Lewis u. Huber (1927), Gregg (1931), und Greisheimer (1931) alle nur geringfügige Zunahme beobachtet. Nach Gregg erfolgt solche geringe Zunahme wahrscheinlich nicht durch die Glykogenbildung von Fettsäure, sondern von Glyzerin. Duells, Butts, Blunden, Cutler u. Knott (1936) haben bei Hungerratten, an weche verschiedene Fette verfüttert wurden, die Zunahme des Leberglykogens untersucht und gefunden, dass die erhöhte Menge bei der Darreichung der natürlichen Fette sich fast gleich verhält, wie die bei solcher des Glyzerins. Okii (1934) wies bei Hungerkaninchen durch die Darreichung von Fettsäure oder mit der Gallensäure zugegesetzter Fettsäure die Zunahme des Leberglykogens nach; aber man kann wegen der grossen Schwankung der Glykogenmenge bei den einzelnen Fällen, mit diesem Ergebnis allein nicht zu dem Schluss gelangen, dass das Kohlehydrat aus Fett gebildet wird.

Aus dem Obigen geht hervor, dass die Frage der Bildung des Zuckers von der Fettsäure im Tierkörper noch nicht eindeutig geklärt ist; deshalb haben wir in Hinblick auf die Klärung dieser Frage die nachstehenden Versuche durchgeführt.

## II. VERSUCHSERGEBNISSE.

### *Versuch 1.*

Den Tauben wurde täglich je 3,0 g von folgendermassen zusammengesetzter Diät pro 100 g Körpergewicht zwangsweise verfüttert. Die Fettmenge wurde mit dem Verlauf von Tagen allmählich in einer umgekehrten Proportion gegenüber der Herab-

## Diät:

Stärke	80 g
Fett	5 g
Kasein	7 g
Anorganische Salze (McCollum u. Simmonds Nr. 115)	4 g
Lebertran	2 g
Hefe	4 g
Zitronensaft	2 Tropfen

setzung der Stärkemenge erhöht, und nach dem 10. Tage wurden sie mit vollkommen stärkefreier Diät ernährt. Nachdem wir solche Fettdiät an die Tauben während 25 Tagen verfüttert hatten, haben wir die Leberglykogenmenge bestimmt und die Ergebnisse in der Tabelle I erhalten. Als Glykogengehalt wurde der durch Hydrolyse nach der Methode von Pflüger-Suto (1931) abgespaltene Zucker nach Hagedorn u. Jensen bestimmt und als Glykogen berechnet angegeben.

TABELLE I.

Tier-Nr.	Leberglykogen (%)	Körpergewicht (g)		
		Anfang	Ende	Ab-u. Zunahme
1	1,86	340	330	-10
2	1,65	330	330	0
3	2,10	300	300	0
4	1,56	280	300	+20
5	1,47	290	290	0
6	2,21	240	250	+10
Mittel	1,81	297	300	+ 3

Wie die Ergebnisse in Tabelle I zeigen, führt die kohlehydratfreie Fettdiät, selbst bei längerer Verfütterung an Tauben, zu fast keiner Schwankung im Körpergewicht; der allgemeine Zustand ist normal und auch die Leberglykogenmenge ist der bei normaler Diät fast gleich.

*Versuch 2.*

Nach den obigen Ergebnissen kann man die Tauben mit einer



Kohlehydratfreien Fettdiät längere Zeit füttern, und auch die Leberglykogenmenge ist dabei fast die gleiche wie bei normaler Diät. Also muss man schliessen, dass dieses Glykogen entweder von dem Fett oder von dem Eiweiss gebildet wird. Es ist schon durch Untersuchungen vieler Autoren eindeutig bewiesen, dass im Tierkörper die Zuckersubstanz aus Eiweiss gebildet werden kann. Deshalb muss man die zuzuführende Eiweissmenge auf das physiologische Minimum beschränken, um die Zuckerbildung aus Eiweiss zu vermeiden. Um das letztere zu bestimmen, haben wir den nachstehenden Versuch unternommen.

Bei den Tauben, welchen wir täglich eine Diät folgender Zusammensetzung: 80 g Olivenöl, 4 g anorganische Salze und 3 g Oryzanin (Vitamin B-Komplex), je 3 g pro 100 g Körpergewicht verabreicht haben, wurden unter Anlegung der Kotfistel Kot und Harn getrennt entnommen; darauf haben wir die im Harn ausgeschiedene Stickstoffmenge bestimmt und von dieser Menge die Menge des täglich zersetzten Eiweisses errechnet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle II.

TABELLE II.

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)	Eiweiss (g)
7	240	0,82
8	370	1,06
„	„	0,79
„	„	0,89
9	310	1,00
Mittel	332	0,91

Nach den Ergebnissen in Tabelle II beträgt die Menge des täglich zersetzten Körpereiwisses bei den mit der kohlehydrat- und eiweissfreien Diät gefütterten Tauben 0,76–1,0 g im Durchschnitt 0,91 g.

Die von uns im Versuch 1 den Tauben verabreichte Kaseinmenge der Diät ist etwas geringer als diese Menge; daher kann man annehmen, dass das Leberglykogen im Versuch 1 nicht von

dem zugeführten Kasein gebildet wurde, sondern wahrscheinlich von dem Fett.

### Versuch 3.

Wir haben nun auf Grund obiger Versuche an Tauben während 60 Tagen die aus 80 g Olivenöl, 8 g Kasein, 4 g anorganischen Salzen und 3 g Oryzanin (Vitamin B-Komplex) bestehende Diät je 3 g pro 100 g Körpergewicht täglich verfüttert und bei der Bestimmung des Leberglykogens die Resultate in Tabelle III erhalten.

TABELLE III.

Tier-Nr.	Leberglykogen (%)	Körpergewicht (g)		
		Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme
10	1,23	350	330	-20
11	1,46	330	320	-10
12	1,33	360	360	0
13	1,11	290	310	+20
Mittel	1,28	320	330	+10

Auch nach dieser Tabelle ergeben sich die gleichen Resultate wie beim Versuch 1, indem das Körpergewicht geringer Schwankung unterliegt und die Leberglykogenmenge sich beinahe gleich verhält wie bei normaler Diät.

### ZUSAMMENFASSUNG.

Aus den oben beschriebenen Versuchen haben wir erkannt, dass bei den mit kohlehydratfreier Fettdiät, bei welcher der Eiweissgehalt bis auf das physiologische Minimum beschränkt ist, für längere Zeit gefütterten Tauben die Leberglykogenmenge von der bei normaler Diät nicht unterschiedlich ist. Folglich kann man daraus wohl schliessen, dass dieses Leberglykogen wahrscheinlich vom Fett gebildet wird.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des Fonds für wissenschaftliche Forschung des Unterrichtsministeriums ausgeführt.

(Y. Sueyoshi.)



LITERATUR.

- Ascher u. Calvo-Criado (1925): Biochem. Z., **164**, 76.  
 Body, Lewis u. Huber (1927): J. Biol. Chem., **75**, 715.  
 Chaikoff (1927): J. Biol. Chem., **74**, 203.  
 Duell, Butts, Blunden, Cutler u. Knott (1936): J. Biol. Chem.,  
**117**, 119.  
 Gregg (1931): J. Nutrit., **4**, 385.  
 Greisheimer (1931): J. Nutrit., **4**, 411.  
 Hawley, Johnson u. Mulin (1933): J. Nutrit., **6**, 523.  
 Jost (1931: Z. physiol. Chem., **197**, 90.  
 Kroh u. Lindhard (1920): Bioch. J., **14**, 290.  
 Mering (1889): Z. f. klin. Med., **15**, 431.  
 Mitchell (1933): J. Nutrit., **6**, 482.  
 Moritz u. Prausnitz (1890): Z. f. Biol., **27**, 81.  
 Okii (1934): J. Biochem., **20**, 37.  
 Pflüger-Suto (1931): Suto-mediz.-chem. Mikrobestim.-Methode I Aufl.  
 224.  
 Rapport (1930): Physiol. Rev., **10**, 349.  
 Ringer u. Lusk (1910): Z. physiol. Chem., **66**, 106.  
 Rosenfeld (1912): Biochem. Z., **42**, 403.  
 Takao (1926): Biochem. Z., **172**, 272.  
 Toenniessen u. Brinkmann (1938): Z. physiol. Chem., **252**, 169.



# ÜBER DIE ZUCKERBILDUNG AUS FETT IM TIERKÖRPER.

## II. Mitteilung.

### Über die B<sub>1</sub>-Avitaminose bei kohlehydratfreier Fettdiät.

VON

KIKUSUKE TOOYAMA.

(Aus dem mediz.-chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1941)

## I. EINLEITUNG.

In unserer ersten Mitteilung (1942) haben wir bei den Tauben, welche mit einer kohlenhydratfreien und die Eiweissmenge auf das physiologische Minimum beschränkten Fettdiät gefüttert wurden, beobachtet, dass sie immer eine nicht geringe Leberglykogenmenge erhielten. Da in diesem Falle das Fett als Energiequelle angewendet werden könne, ist auch die folgende Annahme möglich, dass vor der Darreichung der Fettdiät vorhandenes Glykogen unverbrannt in der Leber zurückbleibt. Wenn aber das Leberglykogen wirklich auch bei der Fettdiät beständig verbrennte, dann müsste B<sub>1</sub>-Avitaminose zustandekommen, falls man zugleich mit der Zufuhr des Vitamins B aufhört. Um diese Verhältnisse zu klären, haben ich die nachstehenden Versuche durchgeführt.

## II. VERSUCHSERGEBNISSE.

### Versuch 1.

Auf unsere vorigen Versuchsergebnisse gestützt, habe ich den Tauben die folgendermassen zusammengesetzte, Vitamin B nicht-enthaltende, kohlenhydratfreie und die Eiweissmenge auf das physiologische Minimum beschränkte Fettdiät je 3 g pro 100 g Körpergewicht täglich zwangsweise zugeführt, um zu erfahren, ob die B<sub>1</sub>-Avitaminose in Erscheinung tritt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle I wiedergegeben.



## Fettdiät:

Olivenöl	80 g
Kasein	8 g
Anorg. Salze (McCollum)	4 g
Erhitzte Hefe	4 g
Lebertran	2 g
Zitronensaft	2 Tropfen.

TABELLE I.

Tier-Nr.	Körpergew. (g)	Symptome (gefund. Tage)		Lebensdauer (Tage)
		Ataxie	Krampf.	
28	350	30	31	32
29	430	29	33	36
30	400	34	44	47
31	330	41	42	51
32	490	43	47	52
33	340	47	52	55
34	350	46	57	59
35	410	46	58	60
36	430	48	60	62
37	310	55	61	63
38	450	51	60	64
39	400	56	61	65
Mittel	390	44	51	53

Nach den Ergebnissen in Tabelle I kommt es zur Lähmung in den Beinen. Die Lähmung tritt durchschnittlich am 44 Tage, der Krampf durchschnittlich am 51 Tage in Erscheinung. Die Lebensdauer beträgt 53 Tage im Mittel. Hieraus geht hervor, dass bei Tauben, die unter kohlenhydratfreier Fettdiät gehalten wurden, die Symptome von B<sub>1</sub>-Avitaminose hervorgerufen werden.

*Versuch 2.*

Wie der Versuch 1 zeigt, traten bei Tauben die Symptome von Avitaminose auf, als an sie eine kohlenhydratfreie Fettdiät verfüttert und Vitamin B<sub>1</sub> nicht zugeführt wurde.

Ich habe weiter während der Verfütterung dieser Diät die

Leberglykogenmenge und die Schwankung der Blutzuckermenge untersucht. Die Bestimmung der Glykogenmenge geschah gemäss der Pflüger-Sutoschen (1931), die der Blutzuckermenge gemäss der Hagedorn-Jensenschen Methode.

Es seien zunächst die ermittelten Ergebnisse an Tauben aufgeführt, die mit normaler Diät aus unpoliertem Reis und Gemüse während einer Woche gefüttert worden sind.

TABELLE II.

Nr. Tier-	Leber-Glykogen (%)	Blut-Zucker (%)
40	1,66	0,194
41	2,18	0,186
42	2,27	0,190
Mittel	2,03	0,190

Aus den Ergebnissen in Tabelle II erkennt man, dass die Leberglykogenmenge bei normaler Diät 1,66%–2,27% (Mittelwert 2,03%), die Blutzuckermenge 0,186–0,194% (Mittelwert 0,190%) beträgt.

Es wurde dann die aus 80 g Olivenöl, 8 g Kasein und 4 g anorganischen Salzen bestehende Diät je 3 g pro 100 g Körpergewicht täglich während 10 Tagen verfüttert und bei Bestimmung der Leberglykogen- und Blutzuckermenge wurden die Ergebnisse in Tabelle III gewonnen.

TABELLE III. (Fütterungstage 10.)

Tier- Nr.	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
	Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
45	315	305	–10	—	—	1,54	0,210
46	305	320	+15	—	—	1,19	0,194
47	350	330	–20	—	—	1,37	0,174
Mittel	323	318	– 5	—	—	1,36	0,192

Nach den Ergebnissen in Tabelle III unterliegt das Körpergewicht geringer Schwankung und kommen die Symptome der Avitaminose noch nicht zum Vorschein. Die Leberglykogenmenge zeigt hierbei einen Mittelwert von 1,36% und der Blutzucker einen solchen von 0,192% ; es ist demnach kein wesentlicher Unterschied gegenüber der normalen Diät erkennbar.

Die Tabelle IV bringt sodann die ermittelten Ergebnisse an Tauben, die 20 Tage lang die gleiche Diät erhalten hatten.

TABELLE IV. (Fütterungstage 20.)

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
	Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
48	310	290	-20	—	—	1,20	0,197
49	315	315	0	—	—	1,72	0,188
50	320	315	- 5	—	—	1,49	0,200
51	295	295	0	—	—	1,92	0,210
Mittel	310	304	- 6	—	—	1,58	0,199

Aus den Ergebnissen in Tabelle IV erkennt man, dass auch hier das Körpergewicht geringer Schwankung unterliegt und die Symptome der Avitaminose nicht zutage treten. Die Leberglykogenmenge zeigt einen Mittelwert von 1,58% und der Blutzucker einen solchen von 0,199% ; sie verhalten sich demnach zu denen bei normaler Diät nicht unterschiedlich.

In den Tabellen V A und B sind alsdann die ermittelten Ergebnisse an Tauben wiedergegeben, die 30 Tage lang die gleiche Diät erhalten hatten.

Nach den Ergebnissen in Tabelle V A treten bei den Tieren keinerlei Symptome in Erscheinung; auch das Körpergewicht unterliegt geringer Schwankung. Die Leberglykogenmenge zeigt einen Mittelwert von 1,22% und die Blutzuckermenge einen solchen von 0,203% ; sie verhalten sich demnach zu denen bei normaler Diät nicht unterschiedlich. Jedoch kam es, wie die Tabelle V(B) zeigt, bei den Tieren Nr. 56-60 nach 27-30 tägiger Verfütterung



TABELLE V A. (Fütterungstage 30.)

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
	Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
52	310	310	0	—	—	1,22	0,216
53	350	360	+10	—	—	1,11	0,194
54	340	360	+20	—	—	1,05	0,202
55	355	340	-15	—	—	1,50	0,202
Mittel	338	342	+ 4	—	—	1,22	0,203

TABELLE V B. (Fütterungstage 30.)

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
	Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
56	300	285	-15	28	—	1,05	0,231
52	315	320	+ 5	29	—	0,93	0,229
58	375	360	-15	30	—	0,85	0,226
59	405	360	-35	28	30	0,73	0,258
60	440	415	-25	27	29	0,80	0,256
Mittel	375	348	-27	28	—	0,87	0,240

zur Lähmung in den Beinen, schliesslich zur Ataxie. Bei den Tieren Nr. 59 und 60 führte die Verfütterung je am 30. und 29. Tage zu Opisthotonus. Die Abnahme des Körpergewichtes war bei den Krampftieren Nr. 59 und 60 beträchtlich. Die Leberglykogenmenge mit einem Mittelwert von 0,78% zeigte geringe Unterschiede gegenüber der bei normaler Diät. Der Blutzucker, dessen Mittelwert 0,240% betrug, zeigte eine Zunahme gegenüber dem bei normaler Diät, besonders deutlich bei den Krampffällen.

Die Tabellen VI A und B geben die ermittelten Ergebnisse an Tauben wieder, die über 30 Tage die gleiche Diät erhalten hatten.

Aus den Ergebnissen in Tabelle VI(A) erkennt man, dass bei

den Tieren, bei welchen trotz der 40 täglichen Verfütterung keinerlei Symptome zum Vorschein kamen, die Schwankung des Körpergewichtes geringt ist. Das Leberglykogen zeigte hierbei einen Mittelwert von 0,88% und der Blutzucker einen solchen von 0,198% ; sie weisen demnach gegenüber denen bei normaler Diät keinen grossen Unterschied auf.

TABELLE VI A. (Fütterungstage 40.)

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
	Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
61	335	325	-10	—	—	0,98	0,212
62	360	350	-10	—	—	0,65	0,190
63	370	370	0	—	—	1,03	0,194
Mittel	355	348	- 7	—	—	0,88	0,198

TABELLE VI B. (Fütterstage 35-52.)

Tier-Nr.	Fütter-Tage	Körpergewicht (g)			(gefund. Tage) Symptome		Glykogen (%)	Blutzucker (%)
		Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf		
64	35	240	220	-20	28	29	0,79	0,297
65	37	325	320	- 5	33	36	0,84	0,271
66	40	355	320	-35	35	35	0,67	0,294
67	49	415	340	-75	43	47	0,60	0,271
68	52	340	280	-60	48	51	0,72	0,249
Mittel	42	335	296	-39	37	39	0,72	0,276

Wie die Tabelle VI(B) zeigt, tritt die Lähmung in den Beinen frühestens am 28. Tage und spätestens am 48. Tage auf; der Krampf frühestens am 29. Tage und spätestens am 51. Tage. Mit Ausnahme des Tieres Nr. 65 war bei allen anderen Tieren eine deutliche Abnahme des Körpergewichtes erkennbar. Jedoch ver-

hielt sich die Leberglykogenmenge im Mittel 0,72% zeigend, zu der bei normaler Diät wenig unterschiedlich, während der Blutzucker, einen Mittelwert von 0,276 zeigend, deutlich zugenommen hat.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen erkennt man, dass bei den Tieren, bei denen nirgendwelche Symptome zum Vorschein kamen, das Körpergewicht nicht abnahm und die Leberglykogen- und Blutzuckermenge gegenüber denen bei normaler Diät nicht unterschiedlich waren. Sogar bei den Lähmungs- und Krampffällen hielt die Leberglykogenmenge einen nicht geringen Wert, während das Körpergewicht auffallend abgenommen hatte. Solche Erscheinung der B<sub>1</sub>-Avitaminose zeigt eindeutig, dass im Körper das Glykogen beständig verbrennt, so dass man annehmen muss, dass das in der Leber in bestimmter Menge vorhandene Glykogen nicht das vor der Darreichung der Fettdiät gewesene vorhanden ist, sondern ein nachher vom Fett gebildetes.

### *Versuch 3.*

Nach den obigen Versuchsergebnissen wurde bei Tauben durch längere Verfütterung kohlehydratfreier und Vitamin B<sub>1</sub>-freier Fettdiät das Auftreten der Lähmung und auch Krampf in den Muskeln beobachtet. Um nun zu bestätigen, dass diese Symptome als Folge des B<sub>1</sub>-Mangels auftreten, wurde den Tieren Vitamin B<sub>1</sub> eingespritzt und beobachtet, ob eine Erholung wieder zustandekommt.

Es wurde festgestellt, dass bei den Fällen mit Krampf durch die einmalige Injektion von Vitamin B<sub>1</sub> (10γ) sowohl die Lähmung als auch der Krampf zur Heilung kamen. Die Lähmung und der Krampf traten aber nach einer bestimmten Zeit wieder auf, als die gleiche Fütterung fortgesetzt wurde. In der Tabelle VII sind die Zeiten des Auftretens der anfänglichen Lähmung und des Krampfes als I. Symptome und die des Auftretens der späten Lähmung und des Krampfes als II. Symptome eingetragen.

Bei dem Tier Nr. 70 trat der Krampf der II. Symptome am 59 Tage ein, der durch die zweite Injektion von Vitamin B<sub>1</sub> wieder abklang. Bei Fortsetzung der gleichen Fütterung machte sich die



TABELLE VII.

Tier-Nr.	I Symptome (gefund. Tage)		B <sub>1</sub> inj. Tage	II Symptome (gefund. Tage)	
	Lähmung	Krampf		Lähmung	Krampf
69	41	41	41	60	61
70	38	38	42	58	59
71	52	54	54	69	70
Mittel	44	44	46	62	63

dritte Lähmung am 70. Tage, der Krampf am 72. Tage bemerkbar. Der Krampf der II. Symptome stellte sich beim Tier Nr. 71 am 70. Tage ein, der durch die zweite Injektion von Vitamin B<sub>1</sub> abklang.

Aus den obigen Versuchsergebnissen geht hervor, dass durch kohlehydratfreie und Vitamin B<sub>1</sub>-freie Fettdiät auftretende Lähmung und Krampf durch die Vitamin B<sub>1</sub>-Verabfolgung geheilt werden können.

Ich habe nun Tauben zugleich mit der Verfütterung der kohlehydratfreien und Vitamin B<sub>1</sub>-freien Fettdiät Vitamin B<sub>1</sub>(10γ) täglich eingespritzt. Da die Tiere, wie Tabelle VIII zeigt, auch am 63. Tage noch störungslos gesund aussahen, wurde am 63. Tage diese Verfütterung eingestellt.

TABELLE VIII. (Fütterungstage 63.)

Tier-Nr.	Körpergewicht (g)		
	Aufang	Ende	Ab-u. Zunahme
72	470	460	-10
73	360	360	0
74	350	320	-30
Mittel	393	380	-13

#### Versuch 4.

Bei obigem Versuch an Tauben wurde beobachtet, dass die kohlehydratfreie Fettdiät ohne Zufuhr des Vitamin B<sub>1</sub> die Er-

scheinung der B<sub>1</sub>-Avitaminose herbeiführt und dass diese verschwindet, sobald Vitamin B<sub>1</sub> eingespritzt wird. Ausgehend von der Vorstellung, dass auch bei Hühnern die gleiche Erscheinung auftreten könne, habe ich gleiche Versuche an Hühnern angestellt, dabei wurde zugleich der Blutzucker und die Blut-Milchsäure gemessen. Der Versuch war der gleiche wie bei Tauben, indem die aus 80 g Olivenöl, 8 g Kasein und 3 g anorganischen Salzen bestehende Diät je 50 g pro kg Körpergewicht täglich zwangsweise verfüttert wurde. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt die Tabelle IX.

TABELLE IX.

Tier-Nr.	Futter-Tage	Körpergewicht (g)			Symptome (gefund. Tage)	
		Anfang	Ende	Ab- u. Zunahme	Lähmung	Krampf
101	41	2170	1980	-190	35	38
102	43	1860	1540	-320	38	40
103	55	1870	1220	-650	45	49
Mittel	46	1966	1580	-380	39	42

Nach den Ergebnissen in Tabelle IX treten ausnahmslos sowohl Lähmung als auch Krampf zutage. Die Symptome des Krampfes klangen ab, als am folgenden Tage nach Auftreten des Krampfes Vitamin B<sub>1</sub> (1 mg) eingespritzt wurde.

Bei der Verfütterung der gleichen Diät mit Vitamin B-Zusatz kamen keine Symptome zum Vorschein, dabei wurden die Menge des Blutzuckers und der Blutmilchsäure bestimmt. Die Milchsäure wurde gemäss der Endo-Tanakaschen Methode (1931) gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle X(A) wiedergegeben.

Aus den Ergebnissen in Tabelle X(A) erkennt man, dass der Blutzucker durchschnittlich 0,189% und die Milchsäure durchschnittlich 20,52 mg% beträgt. Dagegen kam es bei den Fällen ohne Vitamin-B-Zufuhr zu Lähmung und Krampf; bei solchen Fällen nehmen die Menge des Blutzuckers und der Milchsäure, wie Tabelle X(B) zeigt, deutlich zu, indem die erstere durchschnittlich 0,379% und die letztere durchschnittlich 37,09 mg% beträgt.

TABELLE X A.

Tier-Nr.	Fütter-Tage	Symptome (gefund. Tage)		Blut	
		Lähmung	Krampf	Zucker (%)	Milchsäure (mg%)
104	22	—	—	0,179	21,47
105	35	—	—	0,199	16,92
106	48	—	—	0,191	23,17
Mittel	35	—	—	0,189	20,52

TABELLE X B.

Tier-Nr.	Fütter-Tage	Symptome (gefund. Tage)		Blut	
		Lähmung	Krampf	Zucker (%)	Milchsäure (mg%)
107	38	35	37	0,401	40,39
108	40	38	40	0,355	34,33
109	50	45	49	0,383	36,56
Mittel	42	39	43	0,379	37,09

Bei Tier Nr. 108 wurde nach Abklingen der Symptome durch Injektion des Vitamin B<sub>1</sub> die Menge des Blutzuckers und die Milchsäure bestimmt und man konnte erkennen, dass beide zum normalen Wert zurückkehrten, indem die erstere 0,188% und die letztere 16,76 mg% beträgt. Dieses Ergebnis stimmt mit den von früheren zahlreichen Untersuchern berichteten Ergebnissen bei B<sub>1</sub>-Avitaminose überein.

#### Versuch 5.

Die Tatsache, dass bei Fütterung der Tauben mit der kohlehydratfreien und Vitamin B<sub>1</sub>-freien Fettdiät B<sub>1</sub>-Avitaminose in Erscheinung tritt, zeigt, dass im Tierkörper die Verbrennung des Glykogens beständig stattfindet.

Nach den bisherigen Untersuchungen (Stepp, Kühnau u. Schroeder, 1937) soll, je reichlicher die Kohlenhydratzufuhr ist, umso mehr Vitamin B<sub>1</sub> zugeführt werden. Und je reichlicher die



Kohlenhydratmenge ist, desto früher komme es zur Avitaminose, wenn eine ungenügende Vitamin-B-Menge dargereicht wird. Dies konnte auch im folgenden Versuch bestätigen werden.

Den Tauben wurde eine Diät folgender Zusammensetzung und mit Zusatz einer bestimmten Menge von Vitamin (B-Komplex) je 17,5 g täglich zwangsweise verfüttert; dabei wurden die Zeiten des Auftretens der Avitaminose beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle XI wiedergegeben.

Tägliche Diät:

Poliert. Reis	17 g
Kasein	1 g
Anorg. Salz	0,5 g

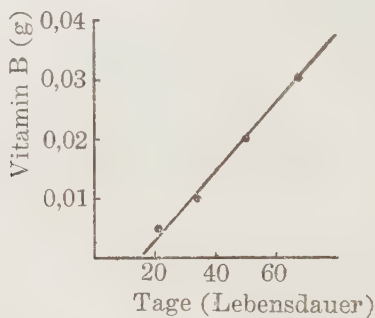
TABELLE XI.

Tier-Nr.	Vit. B (g)	Symptome (gesund. Tage)		Lebensdauer	
		Lähmung	Krampf	Tage	Mittel
75	0,06	—	—	—	—
76	0,04	—	—	—	—
77	0,03	59	—	68	67
78	0,03	62	65	66	
79	0,02	45	51	53	50
80	0,02	43	46	50	
81	0,02	41	45	47	
82	0,01	32	33	36	34
83	0,01	31	33	34	
84	0,01	27	30	33	
85	0,005	17	18	21	

Aus den Ergebnissen in Tabelle XI erkennt man, dass bei täglicher Darreichung des Vitamin B von 0,06 g (Nr. 75) und 0,04 g (Nr. 76) die Tiere noch am 78. Tage gesund sind. Bei den Tieren Nr. 77 und 78, welchen Vitamin B je 0,03 g täglich zugeführt wurde, trat die Lähmung bei ersterem am 59. Tage und bei letzterem am 62. Tage auf, und ihre Lebensdauer betrug im Mittel 67 Tage. Bei den Tieren Nr. 79, 80 und 81 führte die

Verfütterung von Vitamin B täglich je 0,02 g am 41.–45. Tage oder am 43. Tage im Durchschnitt zur Lähmung. Ihre Lebensdauer betrug 47–53 Tage oder durchschnittlich 50 Tage. Bei den Tieren Nr. 82, 83 und 84, welchen Vitamin B täglich 0,01 g dargereicht wurde, trat die Lähmung am 27–32 Tage ein; ihre Lebensdauer betrug durchschnittlich 34 Tage. Die Lebensdauer nimmt parallel mit der Menge des zugeführten Vitamin B zu, wie Abbildung 1 zeigt.

Abb. 1.



Wie in der Tabelle I gezeigt wurde, betragen bei der Fütterung der Tauben mit kohlehydratfreier Fettdiät die Zeiten des Auftretens der Lähmung durchschnittlich 44 Tage und die der Lebensdauer durchschnittlich 53 Tage. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen bei der oben erwähnten Fütterung mit dem 0,02 g Vitamin enthaltenden polierten Reis überein.

Bei der Darreichung von 0,04 g Vitamin B gegen 17 g polierten Reis konnte die Verfütterung längere Zeit ohne Störung fortgesetzt werden. Aber bei der Darreichung von 0,02 g Vitamin B trat die Lähmung am 43. Tage auf und die Lebensdauer betrug 50 Tage. Demzufolge kann man annehmen, dass bei der Darreichung von 0,02 g Vitamin B die Hälfte von 17 g, d. h. 8,5 g poliertem Reis ohne die Zufuhr des Vitamin B benutzt wird und deswegen die Lähmung am 43. Tage auftritt und die Lebensdauer 50 Tage beträgt. Nach dieser Berechnung kann man bei der Verfütterung der kohlehydratfreien Fettdiät annehmen, dass die dem 8,5 g Reis

entsprechende Kohlehydratmenge im Körper verbrennt, weil dabei die Lähmung am 44. Tage auftrat und die Lebensdauer 53 Tage betrug. Obwohl diese Berechnung nicht genau ist, kann man somit annehmen, dass bei der Fettdiät nicht wenig Kohlehydrat verbrennt.

Es ist eine bekannte Tatsache, dass von dem das Fett aufbauenden Glycerin das Kohlehydrat gebildet wird. Aber die als Baustein im Fett enthaltene Glycerinmenge beträgt nicht mehr als etwa 10%, so dass die in obiger Fettdiät täglich enthaltene Glycerinmenge nicht mehr als etwa 1 g ist. Es ergibt sich somit, dass das im Körper entstehende Kohlehydrat von der Fettsäure gebildet wird.

### III. ZUSAMMENFASSUNG UND BESPRECHUNG.

1. Wird an Tauben kohlehydratfreie und die Eiweissmenge auf das physiologische Minimum beschränkte und Vitamin B<sub>1</sub>-freie Fettdiät pro 100 g Körpergewicht je 3 g täglich zwangsweise verfüttert, so treten als Symptome der B<sub>1</sub>-Avitaminose Lähmung in den Beinen und Opisthotonus auf; die erstere tritt durchschnittlich etwa am 44. Fütterungstage, der letztere durchschnittlich am 51. Fütterungstage auf. Die Lebensdauer der Tiere beträgt durchschnittlich 53 Tage.

2. Bei den Tauben, welche mit obiger Fettdiät 10, 20, 30 und über 30 Tage lang gefüttert wurden, wurden das Leberglykogen und der Blutzucker gemessen. Dabei ergab sich, dass bei den Tauben ohne Symptome der Avitaminose die Schwankung des Körpergewichtes klein ist und die Menge des Blutzuckers und des Leberglykogens fast gleich wie bei den normalen Tieren ist, aber bei denen mit Lähmung in den Beinen und Opisthotonus das Körpergewicht deutlich abnimmt und die Menge des Blutzuckers erhöht, während die Menge des Leberglykogens wenig unterschiedlich von der bei normalen Tieren ist.

3. Die durch obige Fettdiät hervorgerufene Lähmung und Krampf heilen durch Einspritzung des Vitamin B<sub>1</sub>. Es treten keinerlei Symptome auf, wenn Vitamin B<sub>1</sub> vom Anfang an eingespritzt wird.



Da bei obiger Fettdiät B<sub>1</sub>-Avitaminose entsteht, kann man erkennen, dass im Körper das Kohlehydrat beständig verbrennt.

4. Bei der Verfütterung der obigen Diät an Hühner treten Lähmung und Krampf auf; dabei haben der Blutzucker und die Milchsäure im Blut deutlich an Menge zugenommen. Diese Symptome klingen nach der Injektion von Vitamin B<sub>1</sub> ab.

5. Nach der Beobachtung der Zeiten des Auftretens der Avitaminose bei Tieren, an welche die Kohlehydratdiät (17 g polierten Reis) mit einem bestimmten Zusatz von Vitamin B täglich zwangsweise verfüttert wurde, zeigt sich, dass je geringer die Vitamin B-Menge ist, desto früher tritt die Avitaminose auf und auch die Lebensdauer der Tiere ist kürzer. Die Tiere, an welche Vitamin B 0,04 g verfüttert wurde, blieben noch über 78 Tage gesund, während bei den Tieren, welchen 0,02 g zugeführt wurde, die Lähmung durchschnittlich am 43. Tage auftrat und die Lebensdauer durchschnittlich 50 Tage betrug. Man kann demnach annehmen, dass bei der Darreichung von 0,02 g Vitamin B die Hälfte von 17 g polierten Reis, d. h. 8,5 g ohne Zufuhr von Vitamin B zu benutzen ist. Die Lebensdauer, welche hierbei 50 Tage beträgt, stimmt mit der von 53 Tagen bei der Fettdiät fast überein. Somit ergibt sich, dass bei Fettdiät täglich 8,5 g Kohlehydrat verbrennt. Da die vom im Fett vorhandenen Glyzerin zu bildende Kohlehydratmenge gering ist, soll das bei Fettdiät im Körper gebildete reichliche Kohlehydrat von der Fettsäure produziert werden.

6. Nach Henry und Gravin (1938 u. 1939) ist im Tierkörper für die Produktion des Fettes aus Kohlehydrat Vitamin B<sub>1</sub> notwendig. Nach meinen Versuchsergebnissen ist für die Produktion des Kohlehydrats aus Fett das Vorhandensein des Vitamin B<sub>1</sub> nicht nötig.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung und Anleitung bei dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des Fonds für wissenschaftliche Forschung des Unterrichtsministeriums ausgeführt.

(Y. Sueyoshi.)

LITERATUR.

- Endo u. Tanaka (1931): Suto-mediz.-chem. Mikro-bestimm.-Methode.  
I. Aufl. 214.
- Henry u. Gravin (1938): J. Biol. Chem., **125**, 653.
- „ „ (1939): J. Biol. Chem., **128**, 45.
- Pflüg.-Suto (1931): Suto-mediz.-chem. Mikrobestimm.-Methode. I. Aufl.  
224.
- Stepp, Kühnau u. Schroeder (1937): Die Vitamine u. ihre Klin.  
Anwend. II. Aufl. 41.
- Sueyoshi u. Tooyama (1942): J. Biochem., **35**, 1.



## FURTHER STUDIES ON THE ORGAN SPECIFICITY.

By

SHIRO FUJIMURA.

(From the Biochemical Institute, Nagasaki Medical collage, Japan.)

(Received for publication, November 1, 1941)

### INTRODUCTION.

In the previous paper (1941) it was concluded that the anti-body detecting function of the alcoholic extract of a brain against an antibrain serum, which reacts organspecifically, depends on the property of the acetone insoluble fraction of the extract, namely the crude phospholipin, and that when the crude phospholipin was purified, it lost the property as the antibody detector. It was also stated that when the hydrogenated crude phospholipin was separated into a water soluble and a chloroform soluble fraction, the active substance can be collected almost entirely in the former fraction.

I have further tried to find out in the animals which fraction of the alcoholic extract of the brain generates the antibody, which reacts organspecifically. The results are given in the following sections.

### Experiment.

#### I. IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE ALCOHOLIC EXTRACT OF THE OX BRAIN.

##### A. *Preparation of the alcoholic extract of an ox brain.*

The fresh brain of an ox was used for the experiment. The meninges and large blood vessels were dissected away from a brain tissue and the blood was removed with a warm water. The material was then grounded thoroughly. To one part of the minced tissue was added nine parts of absolute alcohol and the mixture was allowed to stand at a room temperature for a few days, with an occasional shaking. The extract was then filtered through a filter



paper and kept in a dark place in a stoppered bottle.

### *B. Method for immunization.*

The alcoholic extract of an ox brain as obtained above was concentrated to half a volum in a vacuum at a temperature not exceeding 40°C under a slow current of carbon dioxide. To 3 cc. of this solution, 30 cc. of a 5 per cent pig serum prepared with physiological saline solution was quickly added. After a lapse of one hour at a room temperature, 10 cc. of this mixture were injected into the marginal vein of a rabbit ear.

Rabbits, weighing 2.5–3 kg, and serologically showing no complement fixation reaction, were used for immunization.

An injection was carried out every day for 3 weeks, with an intermission of 3 days between every week. On the 7th day after the last injection, the blood was taken out for the examination of the antibody formation.

### *C. Determination of the degree of the antibody formation*

The degree of the antibody formation was estimated by a complement fixation reaction according to Browning's method.

Antiserum was inactivated by heating it at 56°C for 30 minutes, and diluted to ten times its original volume with physiological saline solution.

Complement. The minimal amount of the guinea-pig serum, which completely hemolyses 0.5 cc. of 3 per cent ox blood corpuscles in the presence of 5 units of ox blood hemolysin, was taken as one unit.

Hemolytic system. Ox blood corpuscles and its hemolysin were used. It consists of 3 per cent suspension of ox blood corpuscles containing 5 units of ox hemolysin in one cc. of it.

Antibody detector. The alcoholic extract of an ox brain, which is prepared by the method described as above, is used as the antibody detector. To use the extract as the antibody detector it is diluted quickly with physiological saline solution to 20 times its volume and after the lapse of from 20 to 60 minutes after the dilution it is used in the complement fixation reaction, in an amount

which just fails to prevent the hemolysis of sensitized ox blood corpuscles, containing two units of complement.

**Procedure.** A series of test tubes containing 0.5 cc. of 10 per cent antiserum, a measured amount of the complement such as 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 15 units in succession are placed in an incubator at 37°C with an occasional shaking. After the lapse of 1.5 hours, 0.5 cc. of the hemolytic system are added to each tube, and the tubes are incubated again at 37°C for 1.25 hours. At the end of this incubation, the degree of hemolysis is read and the degree of the antibody formation is determined.

#### D. Result.

The results of the experiment are shown in the following tables. In the tables, cases where no hemolysis occurred are indicated as (—), and complete hemolysis is shown as (≡), while for intermediate cases (±), (+) and (≡) are used.

TABLE I.

*Antibody producer:* Alcoholic extract of an ox brain.

*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement						Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8	10	12		
34	Ox brain	—	—	—	≡	≡	≡	≡	≡
35	"	—	—	—	+	≡	≡		≡
36	"	—	—	—	+	≡	≡		≡
34	Horse brain	—	≡	≡	≡	≡	≡	≡	
35	"	—	—	—	≡	≡	≡		
36	"	—	—	+	≡	≡	≡		
34	Rabbit brain	—	—	≡	≡	≡	≡	≡	
35	"	—	—	+	≡	≡	≡		
36	"	—	—	+	≡	≡	≡		
34	Pig brain	—	+	≡	≡	≡	≡	≡	
35	"	—	—	—	≡	≡	≡		
36	"	—	—	+	≡	≡	≡		

TABLE II.

*Antibody producer:* Alcoholic extract of an ox brain.*Antibody detector:* Alcoholic extract of various organs of an ox.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
34	Heart	+++	+++	+++	+++	+++	+++
35	"	++	+++	+++	+++		+++
36	"	+++	+++	+++	+++		+++
34	Kidney	+++	+++	+++	+++	+++	
35	"	+++	+++	+++	+++		
36	"	+++	+++	+++	+++		
34	Liver	+++	+++	+++	+++	+++	
35	"	—	+++	+++	+++		
36	"	+++	+++	+++	+++		
34	Muscles	+++	+++	+++	+++	+++	
35	"	+++	+++	+++	+++		
36	"	+++	+++	+++	+++		

As can be seen from the results, the fact that when the alcoholic extract of a brain is mixed with a heterologous protein, such as the pig serum, it becomes a complete antigen, capable of inducing the development of an antibody, which reacts organ specifically, agrees with the results of Heimann and Steinfeld or Brandt, Guth and Müller.

I therefore attempted to isolate an active substance as an antibody producer from the alcoholic extract of an ox brain.

## II. IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE ACETONE SOLUBLE FRACTION AND THE ACETONE INSOLUBLE FRACTION OF THE ALCOHOLIC EXTRACT OF AN OX BRAIN.

### A. Preparation of the acetone soluble fraction and the acetone insoluble fraction.

The alcoholic extract of the ox brain is concentrated in a vacuum at 40°C to a syrupy consistency under a slow current of carbon dioxide. The residue is dissolved in a small amount of ether and an insoluble portion is removed by decantation. To the

etheral solution, an excess of acetone is added and the precipitate, which separated, is collected. These processes are repeated three times. The precipitate thus obtained is a yellowish mass. The acetone soluble fraction is evaporated as described above, dissolved again in acetone and the insoluble portion is removed by a filtration. The filtrate is then evaporated and the white mass is obtained.

### B. Methode for immunization.

The both fractions obtained as above are dissolved in absolute alcohol in a concentration of 5 per cent, diluted with a 5 per cent pig serum and injected into the rabbit in the same manner as in the case of the alcoholic extract of a brain.

### C. Results.

The results are as follows.

TABLE III.

*Antibody producer:* Acetone soluble fraction.

*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
5	Ox brain	++	++	++	++	++	++
6	"	++	++	++	++		++
5	Horse brain	++	++	++	++	++	
6	"	++	++	++	++		
5	Rabbit brain	+	++	++	++	++	
6	"	++	++	++	++		
5	Pig brain	++	++	++	++	++	
6	"	++	++	++	++		

From Table III, IV and V, it is seen that the property of the alcoholic extract of a brain as an antibody producer does not depend on the acetone soluble fraction but on the acetone insoluble fraction, namely the crude phospholipin fraction.

The nitrogen and the phosphorous content of the crude phospholipin was estimated by the micro-Kjeldahl and Youngburg's



method respectively. The atomic ratio of N:P is 1.58.

TABLE IV.

*Antibody producer:* Acetone insoluble fraction.

*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement						Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8	10	12		
42	Ox brain	—	—	—	+	+	+	+	+
43	"	—	—	—	—	—	+	+	+
44	"	—	—	—	—	+	+	+	+
42	Horse brain	—	+	+	+	+	+	+	+
43	"	—	—	+	+	+	+	+	+
44	"	—	+	+	+	+	+	+	+
42	Rabbit brain	—	+	+	+	+	+	+	+
43	"	—	—	+	+	+	+	+	+
44	"	—	+	+	+	+	+	+	+
42	Pig brain	+	+	+	+	+	+	+	+
43	"	—	+	+	+	+	+	+	+
44	"	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLE V.

*Antibody producer:* Acetone insoluble fraction.

*Antibody detector:* Alcoholic extract of various organs of an ox.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
42	Heart	+	+	+	+	+	+
43	"	+	+	+	+	+	+
44	"	+	+	+	+	+	+
42	Kidney	+	+	+	+	+	+
43	"	+	+	+	+	+	+
44	"	+	+	+	+	+	+
42	Liver	+	+	+	+	+	+
43	"	+	+	+	+	+	+
44	"	+	+	+	+	+	+
42	Muscles	+	+	+	+	+	+
43	"	+	+	+	+	+	+
44	"	+	+	+	+	+	+

### III. IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE PURIFIED PHOSPHOLIPIN OF AN OX BRAIN.

#### A. Purification of the crude phospholipin.

As described in the previous paper, the crude phospholipin was purified by the cadmium double salt method. The content of the nitrogen and phosphorous of the purified phospholipin was estimated. The ratio of N:P is 1.09.

#### B. Methode of immunization.

The purified phospholipin thus obtained is dissolved in absolute alcohol in a concentration of 5 per cent and the rabbits were immunized with this solution by the same method as in the case of the crude phospholipin.

#### C. Result.

The results obtained by the immunization experiment with the purified phospholipin are as follows.

TABLE VI.

*Antibody producer:* Purified phospholipin of an ox brain.

*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
52	Ox brain	+++	+++	+++	+++	++	++
53	"	+++	+++	+++	+++		++
54	"	+++	+++	+++	+++		++
52	Horse brain	+++	+++	+++	+++	++	
53	"	+++	+++	+++	+++		
54	"	+++	+++	+++	+++		
52	Rabbit brain	+++	+++	+++	+++	++	
53	"	+++	+++	+++	+++		
54	"	+++	+++	+++	+++		
52	Pig brain	+++	+++	+++	+++	++	
53	"	+++	+++	+++	+++		
54	"	+++	+++	+++	+++		

It is clear from this table that the crude phospholipin fraction of an ox brain loses the antibody producing activity when it is purified. I then tried to determine directly whether or not the property of the crude phospholipin as an antibody producer depends really on the impurities. For this purpose the unsaturated phospholipin was hydrogenated. The hydrogenation of the lipin makes it more hydrophobic and consequently it becomes separable from water soluble impurities.

#### IV. THE IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE CHLOROFORM SOLUBLE FRACTION AND THE WATER SOLUBLE FRACTION OF THE HYDROGENATED CRUDE PHOSPHOLIPIN.

##### *A. Method of the hydrogenation.*

The hydrogenation of the crude phospholipin was performed by means of a platinum black as described in the previous paper.

##### *B. Isolation of the water soluble fraction and the chloroform soluble fraction from the hydrogenated phospholipin.*

The hydrogenated phospholipin was separated into water soluble and chloroform soluble fractions in the same way as described in the previous paper.

##### *C. Method of immunization.*

The chloroform soluble fraction is dried at a low temperature and dissolved in hot alcohol and injected into rabbits with pig serum as a schleppey in the manner as in the case of the crude phospholipin. The water soluble fraction is dissolved in physiological saline solution in the concentration of one per cent and 3 cc. of it were injected into rabbits three times at weekly intervals.

##### *D. Result.*

The results are as follows.

TABLE VII.

*Antibody producer:* Chloroform fraction.*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
61	Ox brain	++	++	++	++	++	++
62	"	++	++	++	++		++
61	Horse brain	++	++	++	++	++	
62	"	++	++	++	++		
61	Rabbit brain	++	++	++	++	++	
62	"	++	++	++	++		
61	Pig brain	++	++	++	++	++	
62	"	++	++	++	++		

TABLE VIII.

*Antibody producer:* Water soluble fraction.*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement					Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8	10		
16	Ox brain	—	++	++	++	++	++	++
17	"	—	—	++	++	++		++
18	"	—	++	++	++	++		++
16	Horse brain	+	++	++	++	++	++	
17	"	—	++	++	++	++		
18	"	—	++	++	++	++		
16	Rabbit brain	++	++	++	++	++	++	
17	"	—	++	++	++	++		
18	"	—	++	++	++	++		
16	Pig brain	+	++	++	++	++	++	
17	"	+	++	++	++	++		
18	"	—	++	++	++	++		

From the Table VII, VIII and IX, it is clear that the antibody detecting property of the crude phospholipin from the brain does not depend on the lipid itself but on the water soluble impurity present in it, and it becomes separable from the lipid by the hydro-



TABLE IX.

*Antibody produced:* Water soluble fraction.*Antibody detector:* Alcoholic extract of various organs of an ox.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
16	Heart	##	##	##	##	##	##
17	"	##	##	##	##		##
18	"	##	##	##	##		##
16	Kidney	##	##	##	##	##	
17	"	##	##	##	##		
18	"	##	##	##	##		
16	Liver	##	##	##	##	##	
17	"	##	##	##	##		
18	"	##	##	##	##		
16	Muscles	##	##	##	##	##	
17	"	##	##	##	##		
18	"	##	##	##	##		

TABLE X.

*Antibody producer:* Acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of an ox brain.*Antibody detector:* Water soluble fraction.

No. of rabbit	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8		
42	—	+	##	##	##	##
43	—	—	—	##	##	
44	—	—	+	##		

genation of the unsaturated lipid. Moreover the water soluble fraction reacts as an antibody detector against the antiserum which is produced by the immunization with the acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of an ox brain.

#### V. IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE GLOBULIN OF AN OX BRAIN.

##### A. *The preparation of the globulin from an ox brain.*

From a fresh ox brain, globulin was prepared by the method

TABLE XI.

*Antibody producer:* Globulin from an ox brain.*Antibody detector:* Alcoholic extract of a brain of an ox or other animals.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement					Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8	10		
10	Ox brain	—	—	+++	+++	+++	+++	+++
15	"	—	—	+++	+++	+++		+++
20	"	—	—	+	+++	+++		+++
10	Horse brain	—	+	+++	+++	+++	+++	
15	"	+	+++	+++	+++	+++		
20	"	—	+	+++	+++	+++		
10	Rabbit brain	—	++	+++	+++	+++	+++	
15	"	+++	+++	+++	+++	+++		
20	"	—	+	+++	+++	+++		
10	Pig brain	+	+++	+++	+++	+++	+++	
15	"	+++	+++	+++	+++	+++		
20	"	+++	+++	+++	+++	+++		

TABLE XII.

*Antibody producer:* Globulin from an ox brain.*Antibody detector:* Alcoholic extract of various organs of an ox.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of complement				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
10	Heart	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	"	+++	+++	+++	+++		+++
20	"	+++	+++	+++	+++		+++
10	Liver	+++	+++	+++	+++	+++	
15	"	+++	+++	+++	+++		
20	"	+++	+++	+++	+++		
10	Kidney	+++	+++	+++	+++	+++	
15	"	+++	+++	+++	+++		
20	"	+++	+++	+++	+++		
10	Muscle	+++	+++	+++	+++	+++	
15	"	+++	+++	+++	+++		
20	"	+++	+++	+++	+++		

described in the previous paper.

*B. Method of immunization.*

3 cc. of one per cent solution of the globulin are injected into rabbits three times at weekly intervals. A week after the last injection the blood was taken out and the formation of the antibody was examined.

*C. Result.*

The results of the experiment are as follows.

TABLE XIII.

*Antibody producer:* Globulin from an ox brain.

*Antibody detector:* Water soluble fraction of the crude hydrolypin of an ox brain.

No. of rabbit	Unit of complement					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
10	—	++	+++	+++	+++	+++	+++
15	—	+++	+++	+++	+++		+++
20	—	++	+++	+++	+++		+++

TABLE XIV.

*Antibody producer:* Acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of an ox brain.

*Antibody detector:* Globulin from an ox brain.

No. of rabbit	Unit of complement					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
42	—	—	+	+++	+++	+++	+++
43	—	—	+	+++	+++		+++
43	—	+	+++	+++	+++		+++

As can be seen from these results, the organ specific antibody can be produced by immunizing rabbits with the globulin prepared from an ox brain, and it reacts also with the antiserum obtained by immunizing rabbits with the crude phospholipin of an ox brain

or with the water soluble fraction of the hydrolipin.

TABLE XV.

*Antibody producer:* Water soluble fraction of the crude hydrolipin of an ox brain.

*Antibody detector:* Globulin from an ox brain.

No. of rabbit	Unit of complement					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
16	—	—	+	≡	≡	≡	≡
17	—	—	≡	≡	≡		≡
18	—	—	+	≡	≡		≡

## SUMMARY.

1. The alcoholic extract of an ox brain becomes a complete antigen capable of inciting the development of the organ specific antibody when it is mixed with a heterologous protein, such as a pig serum.

2. The antibody producing function of the alcoholic extract of an ox brain does not depend on its acetone soluble fraction but on the acetone insoluble fraction, namely the crude phospholipin.

3. When the crude phospholipin is purified, it loses the function of inciting the antibody formation in the animals.

4. By the hydrogenation of the crude phospholipin the active substance as an antibody producer becomes separable from the lipin and can be collected in the water soluble fraction.

5. By immunizing rabbits with the globulin prepared from an ox brain, antibodies which react organ specifically can be produced in the animals.

## REFERENCES.

- Brandt, Guth and Müller (1926): *Klin. Woch.*, **15**.  
 Heimann and Steinfeld (1928): *Zeitschr. für Immunitätsforsch.*, **58**.  
 Fujimura, S. (1941): *Journ. of Biochem.*, **34**, 233.





## STUDIEN ÜBER DIE CARBOHYDRASE.

### 5. Mitteilung.

### Über $\beta$ -Glukosidase und $\beta$ -Galaktosidase von Taka- und Emulsin-Typus.

VON

KATSUMI HORIKOSHI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 2. November 1941)

Über die ausgezeichnete Eignung der *p*-Nitrophenol-Verbindungen als Substrate für die Fermentstudien wurde aus diesem Institut schon oft und genau berichtet, so dass es überflüssig ist, auf Einzelheiten hier wieder einzugehen. Der Anwendungsbereich der *p*-Nitrophenol-Methode ist weit. Aizawa (1939) hat *p*-Nitrophenol-Hexoside synthetisiert und einen einfachen und zuverlässigen Nachweis der Hexosidasen ausgeführt. Dem folgend hat Ezaki (1940) die Einflüsse der verschiedenen Zuckerderivate auf die fermentative Hydrolyse der *p*-Nitrophenol-Hexoside untersucht. Verfasser setzte unter Leitung von Prof. Akamatsu diese Versuche fort und gelangte zu den Ergebnissen, dass die  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase an und für sich voneinander verschieden sind und jedes Ferment wieder scharf in zwei Typen, nämlich Takatypus und Emulsintypus, eingeteilt werden kann. Darauf hat schon Ezaki (1940) in Anbetracht des Verhaltens der  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase gegen Glukose, Galaktose, Phenol- $\beta$ -Glukosid und -Galaktosid hingedeutet. Ich habe zuerst nach Bestätigung der Angabe von Ezaki die Versuche mit Glukonsäure, Galaktonsäure und ihre Laktone ausgeführt und bin zu den Ergebnissen gelangt, die in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Die in der Tabelle mit \* bezeichneten Resultate sind die von Ezaki erzielten und die anderen ohne \* sind die von Verfasser neu

	Taka		Emulsin	
	Hydrolyse des <i>p</i> -Nitro- phenol- $\beta$ - Glukosids	Hydrolyse des <i>p</i> Nitro- phenol- $\beta$ - Galaktosids	Hydrolyse des <i>p</i> -Nitro- phenol- $\beta$ - Glukosids	Hydrolyse des <i>p</i> -Nitro- phenol- $\beta$ - Galaktosids
Glukose	++ *	0 *	0 *	0 *
Glukonsäure	+++ *	0 *	0 *	0
Phenol- $\beta$ - Glukosid	++ *	0 *	+ *	+ *
Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton	+++ *	0	+++	++
Galaktose	0 *	++ *	0 *	0 *
Galaktonsäure	0	++	0	0
Phenol- $\beta$ - Galaktosid	0 *	++ *	+ *	+ *
Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton	0	+++	+++	+++

0.....Keine Hemmung.

+.....schwache Hemmung.

++.....mässige Hemmung.

+++.....starke Hemmung.

erreichten.

Die Versuchsanordnungen bei diesen Experimenten gestalteten sich folgendermassen: Die endliche Konzentration der Substrate, nämlich des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids oder  $\beta$ -Galaktosids, war überall  $M/2000$ . Es wurde soviel der verschiedenen Zuckerarten oder ihrer Derivate zugesetzt, dass ihre endliche Konzentration in den Versuchslösungen  $M/20$  betrug. Die Versuche wurden bei der optimalen Azidität jedes Ferments ausgeführt und das freige-machte *p*-Nitrophenol quantitativ kolorimetrisch in alkalischer Reaktion bestimmt.

Bei Übersicht der oben tabellarisch zusammengestellten Resultate bemerkt man, dass unter den gebrauchten Verbindungen Hexose und Hexonsäure hinsichtlich ihrer Beeinflussung auf die Fermente zu einer Gruppe und Phenolhexosid und Hexonsäure-lakton zu einer anderer Gruppe eingeordnet wurden. Die Wirkung der Hexonsäuren war in qualitativem Sinne gleich der des respektiven Ausgangszuckers, sie war aber weit stärker als die letztere.

Dasselbe Verhältnis war bei Phenolhexosiden und Hexonsäurelaktonen vorhanden, bei denen die Wirkung der Laktone überlegend stark war.

In Bezug auf die hemmende Beeinflussbarkeit der  $\beta$ -Hexosidasen ist die folgende Regelmässigkeit ersichtlich.

Bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosid durch Takadiastase wird die Wirkung im allgemeinen durch Zusatz von Glukose und ihren Derivaten, aber nicht durch den von Galaktose und ihren Derivaten gehemmt (Tabelle A. 1. a, b, c). Von den ersteren ist die Hemmung der Glukose und des Phenol- $\beta$ -Glukosids wohl ausgeprägt, die der Glukonsäure und des  $\gamma$ -Laktons ist aber gemäss der Regel noch weit energischer. Bei der Hydrolyse von dem *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosid durch Takadiastase sieht man ein entsprechendes Verhältnis. Die Hemmung wird nur durch Galaktose und ihre Derivate, aber nicht durch Glukose und ihre Derivate bewirkt und die Wirkung der Galaktonsäure und ihres Laktons übertrifft weit die der Galaktose und des Phenol- $\beta$ -Galaktosids (Tabelle A. 2. a, b, c).

Bei dem Emulsin ist die Sache aber ganz anders. Die Hydrolyse sowohl von *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosid als von *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosid wird hier in bemerkenswerter Weise weder durch Glukose und Glukonsäure noch durch Galaktose und Galaktonsäure gehemmt. Phenol- $\beta$ -Glukosid und Glukonsäurelaktone einerseits und Phenol- $\beta$ -Galaktosid und Galaktonsäurelaktone andererseits üben aber gemeinsam auf die Hydrolyse beider Substrate eine deutliche Hemmung aus, wobei die Hemmung durch die Laktone in stärkerem Masse als durch die Hexoside zum Vorschein kommt (Tabelle B. 1, a, b, c, d; B. 2. a, b, c, d).

Solche Resultate legen den Gedanken nahe, dass die in Takadiastase enthaltene  $\beta$ -Hexosidase von der des Emulsins verschieden ist, weswegen Verfasser vorläufig der ersteren den Namen Taka-Typus und der letzteren den Namen Emulsin-Typus beilegte.

Nun möchte Verfasser ausschliessend an diese Feststellungen die wichtige Frage berühren, nämlich ob die Hydrolyse sowohl des  $\beta$ -Glukosids als auch des  $\beta$ -Galaktosids eigentlich durch eine  $\beta$ -Hexosidase von jedem Typus ausgeübt wird. Bekanntlich ver-



suchten schon oft zahlreiche Autoren die Klärung dieser Frage, aber sie ist noch immer nicht eindeutig entschieden. Es würde zu weit führen, Einzelheiten des Schrifttums hier wiederzugeben.

Wir wollen hinsichtlich dieser Frage zuerst die  $\beta$ -Hexosidase vom Taka-Typus aufnehmen.

Die oben bei Takadiastase erwähnte spezifische Hemmbarkeit ihrer  $\beta$ -Glukosidspaltung durch Zusatz von Glukose und ihren Derivaten einerseits und die der  $\beta$ -Galaktosidspaltung durch Zusatz von Galaktose und ihren Derivaten andererseits zeigten schon eindeutig, dass die Hydrolyse von beiden Substraten wahrscheinlich durch zwei voneinander verschiedene Fermente bewirkt wird. Miwa (1939) hat die Trennung der beiden Takafermente mittels auswählender Wärme-Inaktivierung oder Fraktionierung durch Alkohol-Fällung sowie Adsorption versucht und konnte beobachten, dass der  $\beta$ -Glukosidase- sowie  $\beta$ -Galaktosidasegehalt der Takadiastaselösung dabei je nach dem Fall eine weitgehende gegenseitige Veränderung erfuhr. Dieses Resultat genügt auch, Verfasser die Annahme nahe zu legen, dass es in der Takadiastase zwei verschiedenartige  $\beta$ -Fermente gibt. Wenn dies der Fall wäre, so müssten die beiden Fermente vom Taka-Typus in der Natur nicht immer unbedingt vermischt vorkommen, sondern sie werden auch getrennt, nur das eine oder das andere vorhanden sein. Aus diesem Gedankengang untersuchte Verfasser Fermentlösungen verschiedener Herkunft darauf, ob  $\beta$ -Glukosidase oder  $\beta$ -Galaktosidase vom Taka-Typus wirklich für sich allein vorhanden ist. Die Erwartung konnte verhältnismässig in einfacher Weise verwirklicht werden.

Der dialysierte Extrakt der Früchte von Morokosi, Mohrenhirse (*Andropogon Sorghum*, Brot; var. *vulgaris*, Hack) enthält  $\beta$ -Glukosidase, aber keine  $\beta$ -Galaktosidase. Das optimale PH dieser  $\beta$ -Glukosidase ist 5,0 wie bei Takadiastase. Ihre Beeinflussbarkeit durch die Zuckerarten stimmt in allen Punkten mit der Taka- $\beta$ -Glukosidase überein: Sie wurde durch Glukose und Phenol- $\beta$ -Glukosid und noch in stärkerem Grad durch Glukonsäure und ihr Lakton gehemmt, während Galaktose und deren Derivate gar keine Hemmung darauf ausüben konnten (Tabelle C. 1. a, b, c, d; C. 2). Die  $\beta$ -Glukosidase von Morokosi gehört also zum Taka-Typus.

Das dialysierte Autolysat von Schweinemilz enthält dagegen nur  $\beta$ -Galaktosidase, aber keine  $\beta$ -Glukosidase. Das optimale PH dieser  $\beta$ -Galaktosidase liegt wie das von Takaferment wieder bei 5,0. Ihr Verhalten gegen die Zuckerarten ist dem des Takaferment gleich. Sie konnte nämlich durch Glukose und deren Derivate nicht beeinflusst werden, während sie durch Galaktose, Phenol- $\beta$ -Galaktosid und in noch stärkerem Grad durch Galaktonsäure und ihr Lakton gehemmt wurde (Tabelle D. 1; D. 2. a, b, c, d, e). Daraufhin darf gesagt werden, dass die  $\beta$ -Galaktosidase von Schweinemilz dem Taka-Typus angehört. Die Verschiedenartigkeit der  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase des Taka-Typus konnte also endlich entschieden werden.

Wir sind nun bei der Frage angelangt, ob die  $\beta$ -Fermente des Emulsin-Typus gleichartig sind. Den eingehenden Studien über diese Frage haben sich Helferich und seine Schule gewidmet und viele Mitteilungen wurden schon von ihnen nacheinander in rascher Folge und auch zusammengefasst (1938) gemacht. Sie haben sich zur Trennung und Reinigung der  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase des Emulsins recht verschiedener physikalischer oder chemischer Eingriffe bedient, aber es blieb diesen deutschen Autoren nichts andres übrig, als zu schliessen, dass die Hydrolyse des  $\beta$ -Glukosids und des  $\beta$ -Galaktosids durch ein einziges Emulsinferment bewirkt werden muss. Miwa (1939) war auch derselben Meinung. Gegen diese Ein-Enzymtheorie stand Hofmann auf (1934). Er konnte tatsächlich beobachten, dass die Samen der *Rosa canina* sowie die Mandarinenkerne im Gegensatz zum Emulsin reichlich  $\beta$ -Galaktosidase aber wenig  $\beta$ -Glukosidase, also beide Fermente im umgekehrten Verhältnis zum Emulsin, enthalten und weiter, dass Sojabohnen und *B. coli* sowie Delbrücki nur  $\beta$ -Galaktosidase, aber keine  $\beta$ -Glukosidase enthalten, während in *Mucor javanicus* ausschliesslich  $\beta$ -Glukosidase vorhanden ist. Diese Ergebnisse konnten wohl damals ein kräftiger Gegenbeweis zur Ein-Enzymtheorie sein. Man weiss aber nun, dass die beiden Fermente von Taka-Typus verschiedenartig sind, und da es sich überhaupt noch nicht entscheiden liess, ob jene von Hofmann untersuchten Fermente dem Taka- oder Emulsin-Typus angehören, ist man noch

nicht in der Lage, ohne weiteres der Angabe von Hofmann zustimmend die Hydrolysierbarkeit des  $\beta$ -Glukosids und  $\beta$ -Galaktosids durch ein einziges Emulsinenzym auszuschliessen. Die von Ezaki und von Verfasser erzielten Ergebnisse, dass die Hydrolyse der beiden Substrate durch Emulsin gemeinsam bei Zusatz der Phenolverbindungen sowie Onsäurelaktone von jedem Zucker gehemmt wird, sprechen scheinbar für die Ein-Enzymtheorie. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei den Fermenten des Taka-Typus wurden aber weitere Studien über Emulsin ausgeführt.

Wenn auch die  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase des Emulsins nicht ein Ferment wäre, lässt ihr gemeinsames Verhalten gegen die Zuckerderivate schon ihre äusserst nahe Verwandtschaft im chemischen Aufbau, sei es des Ferments selbst oder des innigen Begleitstoffs, annehmen. Verfasser hielt daher den Versuch zur Trennung der beiden Emulsinfermente mittels physikalischen oder chemischen Verfahrens fast für aussichtslos. Deshalb schritt Verf. in anderer Richtung fort und wollte untersuchen, ob  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase des Emulsin-Typus jedes für sich und allein in der Natur vorkommen kann. Verfasser hat sich lange vergebens abgemüht, bis endlich die gewünschten Fermente ausfindig gemacht werden konnten. Fermentlösungen, falls sie nach den Untersuchungen als auf beide Substrate aktiv bewiesen wurden, mussten sie, ohne Rücksicht darauf, ob die Fermente zum Taka-Typus oder zum Emulsin-Typus gehörten, zur Seite gestellt werden. Ohne auf Einzelheiten einzugehen, sollen hier einige Beispiele erwähnt werden. Extrakte der Kaffeebohnen und der schwarzen Sojabohnen, Kuromame, sind fähig bei  $\text{pH } 4,0$  beide Substrate und zwar *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosid stärker als  $\beta$ -Glukosid aufzuspalten, die Fermente in den Extrakten gehören aber zum Taka-Typus. Die dialysierten Autolysate der Schweineleber sowie Niere spalten beide Substrate, obwohl die darin vorhandenen Fermente dem Emulsin-Typus einzuordnen sind. Selbst als bewiesen wurde, dass eine geprüfte Lösung  $\beta$ -Glukosidase oder Galaktosidase allein enthielt, wurde sie dennoch nicht beachtet, falls das Ferment zum Taka-Typus gehörte.

$\beta$ -Galaktosidase vom Emulsin-Typus ist in *B. coli communis*

vorhanden. Verfasser konnte bestätigen, dass diese Bakterien keine  $\beta$ -Glukosidase enthalten, wie schon Hofmann (1934) mitteilte. Jene  $\beta$ -Galaktosidase in den Bakterien wird aber mit dem Ferment des Taka-Typus, obwohl in geringerer Menge, beigemischt, wie der folgende Hemmungsversuch ergab. Die Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids durch diese Bakterien-suspension wurde wohl wie beim Emulsin durch Phenol- $\beta$ -Glukosid, Phenol- $\beta$ -Galaktosid, Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton und Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton gehemmt, doch ausserdem in schwachem Grad auch noch durch Galaktose oder Galaktonsäure. Verf. versuchte nun das Ferment von dem des Taka-Typus zu befreien: das Ziel wurde endlich erreicht, als das Gefrier-Auftau-Verfahren an der Suspension angewandt wurde. Die Galaktosidspaltung mittels der zentrifugierten klaren Lösung konnte nicht mehr durch Glukose, Galaktose, Glukonsäure oder Galaktonsäure, aber wohl durch Phenol- $\beta$ -Glukosid, Phenol- $\beta$ -Galaktosid, Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton und Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton gehemmt werden (Tabelle E. 1; E. 2. b, c, d, e). Ihr  $\text{pH}$ -Optimum war 6,6 (Tabelle E. 2. a).

Nachdem die Existenz der  $\beta$ -Galaktosidase des Emulsin-Typus festgestellt war, wurde auf die  $\beta$ -Glukosidase desselben Typus gefahndet und sie konnte in *Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (O-Form) gefunden werden. Ihre Aktivität war leider gering und sie musste durch Züchten der Bakterien auf dem Schräg-Agar Nährboden, der 1% Salicin enthält, erhöht werden. Die Versuche mit dieser Bakterien-suspension ergaben, dass darin keine  $\beta$ -Galaktosidase, aber wohl eine kräftige  $\beta$ -Glukosidase vorhanden ist, dass ihr optimales  $\text{pH}$  bei 7,0 liegt, und dass sie durch Phenol- $\beta$ -Glukosid, Phenol- $\beta$ -Galaktosid, Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton und Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton gehemmt wird, während sie durch Glukose, Galaktose, Glukonsäure und Galaktonsäure keine Beeinflussung erfährt (Tabelle F. 1. a, b, c, d, e; F. 2). Daraus darf man schliessen, dass  $\beta$ -Glukosidase von *Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (O-Form) zum Emulsin-Typus gehört. Verf. konnte daraufhin zu der Erkenntnis gelangen, dass sowohl  $\beta$ -Glukosidase als auch  $\beta$ -Galaktosidase des Emulsin-Typus natürlich für sich allein existiert. Wie aus den Ergebnissen von Helferich und seinen Mitarbeitern ersichtlich ist, ist es aber vorläufig unmöglich,

die beiden Emulsinfermente voneinander zu trennen. Wenn auch diese untrennbar sein sollten, so kann man doch nicht ohne weiters sagen, dass die beiden Fermente identisch sind. Die bisher nicht gelungene Trennung der beiden Fermente rührt möglicherweise von ihrer sehr nahen Verwandtschaft im Fermentaufbau her.

Die oben ausführlich mitgeteilten Versuchsergebnisse erlauben den Schluss, dass die  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase eigentlich verschiedenen Fermenten angehören und sie je in zwei Typen, nämlich Taka- und Emulsin-Typus, eingeteilt werden können.

## EXPERIMENTELLER TEIL.

### I. Substrate.

a) *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosid war das Präparat, das vor kurzem von Aizawa (1939) hergestellt worden ist.

b) *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosid wurde nach der Methode von Aizawa (1939) dargestellt. Es bildet farblose, nadlige Krystalle, frei von Krystallwasser, die bei 178°C schmelzen;  $[\alpha]_D^{18} = -74^\circ.7$ .

c) Glukose von Merck.

d) Galaktose von Takeda.

e) Phenol- $\beta$ -Glukosid und (f) Phenol- $\beta$ -Galaktosid waren die Präparate, die von Ezaki (1940) hergestellt worden sind. Die beiden enthalten 1 Mol. Krystallwasser, das erste schmilzt bei 176°C,  $[\alpha]_D^{20} = +71^\circ$  und das andere zeigte einen Schmelzpunkt von 147°C und  $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ .

g) Glukonsaures Calcium von Takeda.

h) Galaktonsaures Calcium wurde nach der Angabe von Clowes und Tollens (1899) hergestellt. Es enthält 4 Mol. Krystallwasser und zeigt  $[\alpha]_D^{21} = +1.5^\circ$ .

i) Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton wurde nach der Methode von Nef (1914) dargestellt. Das mit absolutem Alkohol umkrystallisierte, fein nadlige Präparat zeigt einen Schmelzpunkt von 133°C;  $[\alpha]_D^{18} = +68^\circ$ .

j) Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton wurde, wie bei Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton, aus galaktonsaurem Calcium hergestellt. Der fein nadlige Krystall schmilzt bei 110°C und zeigt  $[\alpha]_D^{18} = -71^\circ$ .



## II. Fermentlösung.

a) Wässrige Lösung von Takadiastase sowie Emulsin (Merck) wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert.

b) Dialysiertes Autolysat von Früchten der Mohrenhirse = $\beta$ -Glukosidase von Taka-Typus.

Zermahlene Früchte der Mohrenhirse wurden in 3 facher Menge Wasser unter Toluol-Chloroform-Zusatz 2 Tage bei 37°C stehen gelassen, das Filtrat dann gegen destilliertes Wasser dialysiert.

c) Dialysiertes Schweinemilz-Autolysat = $\beta$ -Galaktosidase von Taka-Typus.

Zermahlene Schweinemilz wurde in 2 facher Menge Wasser unter Toluol-Chloroform-Zusatz 2 Tage bei 37°C stehen gelassen, und das Filtrat gegen destilliertes Wasser dialysiert.

d)  $\beta$ -Galaktosidase von Emulsin-Typus der *B. coli communis*. Nachdem *B. coli communis* auf 1% igem Milchzucker-Agar-nährboden (pH 7,0) gezüchtet worden war, stellte man eine Suspension in sterilem destilliertem Wasser her, liess sie in Kältemischung gefrieren und erwärmte sie wieder auf 37°C. Nach mehrfacher Wiederholung dieser Manipulation wurde die Lösung zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit zum Versuch verwendet.

e) Suspension von *Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (0-Form) = $\beta$ -Glukosidase vom Emulsin-Typus.

*Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (0-Form) wurde 20–24 Stunden auf Agarnährboden kultiviert, welcher 1% Salicin enthielt und dessen pH mit M/10 phosphorsaurem Natrium auf 8,0 korrigiert worden war. Die Suspension wurde in sterilem destilliertem Wasser hergestellt. Alle Eingriffe wurden unter sterilen Kautelen durchgeführt.

f) Sonstige Fermentlösungen wurden aus den entsprechenden Ausgangsmaterialien durch 2 tägige Extraktion mittels 2–3 Volumen Wasser bei 37°C und anschliessende Dialyse bereitet.

Die Konzentration der Fermentlösungen wurde im allgemeinen so gewählt, dass das *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Hexosid bei dem Versuch ohne Zuckerzusatz (Kontroll-Versuch) nach der unten angegebenen

Bedingung in 1 Stunde 30–40% gespalten wurde.

### III. Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden bei 37°C und bei optimaler Azidität des betreffenden Fermentes ausgeführt. Als Pufferlösung wurden  $M/10$  Phosphat- und  $M/2$  Acetat-Gemisch verwendet.

Die Versuchslösungen bestanden aus:

- 1) bei Versuch ohne Zuckerzusatz (Kontroll-Versuch);
 

$M/1000$ <i>p</i> -Nitrophenol- $\beta$ -Hexosid	10,0 ccm
Fermentlösung	2,0 „
Pufferlösung	5,0 „
Wasser	3,0 „
Toluol	2–3 gtt.
- 2) bei Versuch mit Zuckerzusatz;
 

$M/1000$ <i>p</i> -Nitrophenol- $\beta$ -Hexosid	10,0 ccm
Fermentlösung	2,0 „
Zucker-Pufferlösung	8,0 „
Toluol	2–3 gtt.

Die endliche Konzentration der Substrate war  $M/2000$ . Das Mengenverhältnis des Substrates zum zugesetzten Zuckerderivate war 1:100.

Der Zusatz der Zuckerderivate wurde in folgender Weise ausgeführt. Die Pufferlösung wurde mit Wasser 5:3 gemischt und mit dieser Lösung  $M/8$  Lösung der Zuckerderivate hergestellt. Die in solcher Weise bereitete Lösung der Zuckerderivate wird in der oben angegebenen Zusammensetzung der Versuchslösungen einfachheitshaiber Zucker-Pufferlösung genannt. In jeder Versuchslösung waren 8,0 ccm Zucker-Pufferlösung auf 20,0 ccm verdünnt vorhanden. Endliche Konzentration der Zuckerderivate war also  $M/20$ .

Was die Kolorimetrie des abgespalteten *p*-Nitrophenols betrifft, vergleiche die Mitteilung von Tanaka (1938), Aizawa (1939), Ezaki (1940) und anderen. Folgendes sei hier erwähnt: In dem Trichloressigsäurefiltrat der mit Calciumhexonat versetzten Versuchslösungen entsteht bei Alkalisierung mit Natriumcarbonat

selbstverständlich Niederschlag von Calciumcarbonat. Freies *p*-Nitrophenol wird aber daran nicht adsorbiert, die Lösung kann daher zur Kolorimetrie sogleich filtriert werden. Bei den Versuchen mit Bakteriensuspension war der Trichloressigsäurezusatz nicht hinreichend, um ein wasserklares Filtrat zu liefern. Bei den Versuchen mit den pflanzlichen Extrakten kann es manchmal vor, dass das Trichloressigsäurefiltrat noch durch natürliche Farbstoffe verfärbt war. In solchen Fällen kam anstatt 10% Trichloressigsäure 2% Bleiacetat zur Verwendung; Blei im Filtrat wurde als Carbonat entfernt. Wie Ohno (1941) angab, wurde *p*-Nitrophenol von Bleiacetat nicht gefällt und bei alkalischer Reaktion auch nicht von Bleicarbonat adsorbiert.

#### IV. Ergebnisse.

A) Takadiastase (0,5%). optimale Acidität =  $\text{pH } 5,0$ .

1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

a) Einfluss der Glukose, Galaktose, des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.

Hemmung; Glukose = + + ; Phenol- $\beta$ -Glukosid = + +  
Galaktose = 0 ; Phenol- $\beta$ -Galaktosid = 0

$\text{pH } 5,0$	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	42	11	41	8	40
„ 2 Std.	67	18	70	13	68
„ 3 Std.	89	23	91	17	90

b) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium = + + +  
Galaktonsaures Calcium = 0

$\text{pH } 5,0$	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	44	6	43
„ 2 Std.	63	9	62
„ 3 Std.	76	11	75

- c) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.  
 Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +  
 Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = 0

PH 5,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	44	0	43
„ 2 Std.	66	0	62
„ 3 Std.	78	Supr	75

- 2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

- a) Einfluss der Glukose, Galaktose, des Phenol- $\beta$ -Glukosids und des Phenol- $\beta$ -Galaktosids.

Hemmung; Glukose = 0; Phenol- $\beta$ -Glukosid = 0  
 Galaktose = + + ; Phenol- $\beta$ -Galaktosid = + +

PH 5,0	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %	Phenol- $\beta$ -Glukosid %	Phenol- $\beta$ -Galaktosid %
Nach 1 Stde.	44	44	10	42	9
„ 2 Std.	59	61	18	60	16
„ 3 Std.	71	72	24	72	21

- b) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium = 0  
 Galaktonsaures Calcium = + +

PH 5,0	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	49	50	9
„ 2 Std.	67	66	16
„ 3 Std.	76	76	21

- c) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.

Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = 0  
 Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +

PH 5,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	46	46	0
„ 2 Std.	61	61	0
„ 3 Std.	72	72	Spur

B) Emulsin (0,4%). optimale Acidität =  $P_H$  6,0.

1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

a) Einfluss der Glukose und Galaktose.

Hemmung; Glukose = 0; Galaktose = 0

$P_H$ 6,0	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %
Nach 1 Stde.	34	34	34
„ 2 Stdn.	52	51	52
„ 3 Stdn.	65	64	65

b) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.

Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid = + +

Phenol- $\beta$ -Galaktosid = + +

$P_H$ 6,0	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	35	21	25
„ 2 Stdn.	56	34	37
„ 3 Stdn.	72	42	48

c) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium = 0

Galaktonsaures Calcium = 0

$P_H$ 6,0	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Kontrolle %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	38	36	47	47
„ 2 Stdn.	50	50	61	61
„ 3 Stdn.	61	60	72	70

d) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.

Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +

Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +

$P_H$ 6,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ - Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	34	Spur.	9
„ 2 Stdn.	52	4	14
„ 3 Stdn.	65	7	18



2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

## a) Einfluss der Glukose und Galaktose.

Hemmung; Glukose=0; Galaktose=0

P <sub>H</sub> 6,0	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %
Nach 1 Stde.	34	34	34
„ 2 Stdn.	52	51	52
„ 3 Stdn.	65	64	65

b) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid = +Phenol- $\beta$ -Galaktosid = +

P <sub>H</sub> 6,0	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	36	24	20
„ 2 Stdn.	58	39	34
„ 3 Stdn.	75	51	42

## c) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium=0

Galaktonsaures Calcium=0

P <sub>H</sub> 6,0	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Kontrolle %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	31	28	36	35
„ 2 Stdn.	46	42	49	50
„ 3 Stdn.	56	52	60	59

d) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -laktons.Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -laktan = + + +Galaktonsäure- $\gamma$ -laktan = + + +

P <sub>H</sub> 6,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Laktan %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktan %
Nach 1 Stde.	34	6	Spur
„ 2 Stdn.	49	9	4
„ 3 Stdn.	59	10	5

## C) Morokosi (Mohrenhirse).

1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

## a) Bestimmung der optimalen Acidität.

	PH 4,0 %	PH 5,0 %	PH 6,0 %	PH 7,0 %	PH 8,0 %
Nach 1 Stde.	33	41	29	17	5
„ 3 Stdn.	68	84	60	35	11

## b) Einfluss der Glukose und Galaktose.

Hemmung; Glukose = ++; Galaktose = 0

PH 5,0	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %
Nach 1 Stde.	39	9	39
„ 2 Stdn.	64	16	63
„ 3 Stdn.	86	21	82

c) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid = +++Phenol- $\beta$ -Galaktosid = 0

PH 5,0	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	40	6	39
„ 2 Stdn.	65	9	64
„ 3 Stdn.	88	11	86

d) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums, des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.

Hemmung; Glukonsaures Calcium = +++

Galaktonsaures Calcium = 0

Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = +++Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = 0

PH 5,0	Kontrolle %	Glukon- saurer Calcium %	Galakton- saurer Calcium %	Glukon- säure- $\gamma$ - Lakton %	Galakton- säure- $\gamma$ - Lakton %
Nach 1 Stde.	40	Spur	40	0	38
„ 2 Stdn.	65	3	67	0	64
„ 3 Stdn.	85	5	87	±	85

2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

	P <sub>H</sub> 4,0 %	P <sub>H</sub> 5,0 %	P <sub>H</sub> 6,0 %	P <sub>H</sub> 7,0 %	P <sub>H</sub> 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	0	0	0	0
„ 2 Stdn.	0	0	0	0	0
„ 24 Stdn.	0	0	0	0	0

## D) Schweinemilz.

1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

	P <sub>H</sub> 4,0 %	P <sub>H</sub> 5,0 %	P <sub>H</sub> 6,0 %	P <sub>H</sub> 7,0 %	P <sub>H</sub> 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	0	0	0	0
„ 2 Stdn.	0	0	0	0	0
„ 24 Stdn.	0	0	0	0	0

2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

## a) Bestimmung der optimalen Acidität.

	P <sub>H</sub> 3,6 %	P <sub>H</sub> 4,0 %	P <sub>H</sub> 5,0 %	P <sub>H</sub> 6,0 %	P <sub>H</sub> 7,0 %	P <sub>H</sub> 8,0 %
Nach 1 Stde.	18	20	22	12	Spur	0
„ 3 Stdn.	41	44	46	28	5	0

## b) Einfluss der Glukose und Galaktose.

Hemmung; Glukose=0; Galaktose=++

P <sub>H</sub> 5,0	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %
Nach 1 Stde.	21	21	3
„ 2 Stdn.	34	35	4
„ 3 Stdn.	45	46	5

c) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid=0Phenol- $\beta$ -Galaktosid=+++

P <sub>H</sub> 5,0	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	20	21	0
„ 2 Stdn.	35	36	Spur
„ 3 Stdn.	45	47	3

## d) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium=0

Galaktonsaures Calcium=+++

PH 5,0	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	22	20	0
„ 2 Std.	35	33	0
„ 3 Std.	45	43	Spur

e) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton=0Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton=+++

PH 5,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	22	21	0
„ 2 Std.	37	35	0
„ 3 Std.	48	45	0

E) *B. coli communis*.1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

	PH 4,0 %	PH 5,0 %	PH 6,0 %	PH 6,6 %	PH 7,0 %	PH 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	0	0	0	0	0
„ 2 Std.	0	0	0	0	0	0
„ 24 Std.	0	0	0	0	0	0

2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

## a) Bestimmung der optimalen Acidität.

	PH 4,0 %	PH 5,0 %	PH 6,0 %	PH 6,6 %	PH 7,0 %	PH 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	0	21	27	24	19
„ 3 Std.	0	0	49	62	55	41

## b) Einfluss der Glukose und Galaktose.

Hemmung; Glukose=0; Galaktose=0

PH 6,6	Kontrolle %	Glukose %	Galaktose %
Nach 1 Stde.	23	22	22
„ 2 Std.n.	39	38	37
„ 3 Std.n.	51	50	48

c) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid = + +Phenol- $\beta$ -Galaktosid = + +

PH 6,6	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	24	11	8
„ 2 Std.n.	37	18	13
„ 3 Std.n.	49	25	17

## d) Einfluss des glukonsauren und galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Glukonsaures Calcium=0

Galaktonsaures Calcium=0

PH 6,6	Kontrolle %	Glukonsaures Calcium %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	23	23	24
„ 2 Std.n.	39	38	39
„ 3 Std.n.	51	50	52

e) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktons und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktons.Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +

PH 6,6	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	24	6	Spur
„ 2 Std.n.	37	10	5
„ 3 Std.n.	49	13	6



F) *Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (0-Form).1) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids.

## a) Bestimmung der optimalen Acidität.

	P <sub>H</sub> 4,0 %	P <sub>H</sub> 5,0 %	P <sub>H</sub> 6,0 %	P <sub>H</sub> 7,0 %	P <sub>H</sub> 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	Spur	28	34	30
„ 3 Stdn.	±	3	62	90	71

## b) Einfluss der Glukose und des glukonsauren Calciums.

Hemmung; Glukose=0; Glukonsaures Calcium=0

P <sub>H</sub> 7,0	Kontrolle %	Glukose %	Glukonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	32	29	34
„ 2 Stdn.	54	49	56
„ 3 Stdn.	71	66	75

## c) Einfluss der Galaktose und des galaktonsauren Calciums.

Hemmung; Galaktose=0; Galaktonsaures Calcium=0

P <sub>H</sub> 7,0	Kontrolle %	Galaktose %	Galaktonsaures Calcium %
Nach 1 Stde.	36	38	35
„ 2 Stdn.	62	64	63
„ 3 Stdn.	82	85	84

d) Einfluss des Phenol- $\beta$ -Glukosids und Phenol- $\beta$ -Galaktosids.Hemmung; Phenol- $\beta$ -Glukosid=++Phenol- $\beta$ -galaktosid=+

P <sub>H</sub> 7,0	Kontrolle %	Phenol- $\beta$ - Glukosid %	Phenol- $\beta$ - Galaktosid %
Nach 1 Stde.	35	8	29
„ 2 Stdn.	61	13	47
„ 3 Stdn.	82	17	62

e) Einfluss des Glukonsäure- $\gamma$ -Laktone und Galaktonsäure- $\gamma$ -Laktone.Hemmung; Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton = + + +Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton = + +

P <sub>H</sub> 7,0	Kontrolle %	Glukonsäure- $\gamma$ -Lakton %	Galaktonsäure- $\gamma$ -Lakton %
Nach 1 Stde.	25	Spur	13
„ 2 Stdn.	43	3	23
„ 3 Stdn.	59	4	30

2) Hydrolyse des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Galaktosids.

	P <sub>H</sub> 4,0 %	P <sub>H</sub> 5,0 %	P <sub>H</sub> 6,0 %	P <sub>H</sub> 7,0 %	P <sub>H</sub> 8,0 %
Nach 1 Stde.	0	0	0	0	0
„ 3 Stdn.	0	0	0	0	0
„ 24 Stdn.	0	0	0	0	0

## ZUSAMMENFASSUNG.

Unter Verwendung des *p*-Nitrophenol- $\beta$ -Glukosids und  $\beta$ -Galaktosids als Substrate wurde die Beeinflussbarkeit ihrer Hydrolyse durch Gegenwart von verschiedenen Zuckerderivaten untersucht, wobei sich herausstellte, dass sowohl  $\beta$ -Glukosidase als auch  $\beta$ -Galaktosidase in Taka- und Emulsin-Typus eingeteilt werden können.  $\beta$ -Glukosidase und  $\beta$ -Galaktosidase sind nicht identisch. Diese Fermente kommen in der Natur manchmal mit einander vermischt vor. Durchsuchung auf die alleinige Existenz jeden Ferments hatte folgende Ergebnisse:

1.  $\beta$ -Glukosidase vom Taka-Typus ist in den Früchten der Möhrenhirse (Japanisch: Morokosi) vorhanden.

2.  $\beta$ -Galaktosidase vom Taka-Typus wird in dem dialysierten Autolysat der Schweinemilz bewiesen.

3.  $\beta$ -Glukosidase vom Emulsin-Typus kommt in *Proteus vulgaris* X<sub>19</sub> (0-Form) vor.

4.  $\beta$ -Galaktosidase vom Emulsin-Typus kann man aus *Coli*-Bazillen durch Gefrier-Auftau-Verfahren herstellen.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die Herrn Professor Akamatsu zur Förderung der wissenschaftlichen Forschungen von dem Unterrichtsministerium zur Verfügung gestellt wurde.

## LITERATUR.

- Aizawa, K. (1939): J. Biochem., **30**, 89.  
Aizawa, K. (1939): Enzymologia, **6**, 321.  
Clowes, G. H. A. und Tollens, S. (1899); Ann. d. Chemie, **310**, 166.  
Ezaki, S. (1940): J. Biochem., **32**, 91.  
Ezaki, S. (1940): J. Biochem., **32**, 107.  
Fujita, H. (1939): J. Biochem., **30**, 69.  
Helfferich, B. (1938): Ergeb. d. Enzymforsch., **7**, 83.  
Hofmann, E. (1933): Biochem. Ztsch., **267**, 309.  
Hofmann, E. (1934): Biochem. Ztsch., **272**, 133.  
Hofmann, E. (1934): Biochem. Ztsch., **272**, 426.  
Hofmann, E. (1934): Naturwiss., **22**, 406.  
Miwa, T. (1939): Kagaku (japanisch), **9**, 94.  
Miwa, T. (1939): Mitt. Hattori-Hôkôkai (japanisch), **7**, 155.  
Nef, J. U. (1914): Ann. d. Chemie., **403**, 329.  
Ohmori, K. (1937): J. Biochem., **26**, 259.  
Ohno, K. (1941): J. Biochem., **33**, 35.  
Tanaka, S. (1939): J. Biochem., **28**, 119.



## ÜBER DIE ABLAGERUNG DES CHAULMOOGRAÖLS IN DEN ORGANEN.

VON

JOKICHI KOYANAGI.

(Aus dem Biochem. Institut der Kumamoto Med. Fakultät.

Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 2. November 1941)

In der früheren Mitteilung (1940 a) hat Verfasser geäußert, dass die Vermehrung des Neutralfettes, welche sich in verschiedenen Organen eines Kaninchens, ausser dem Herz, beobachten lässt, wenn man ihm lange Zeit die die freie Chaulmoografettsäure enthaltende Chaulmoograölemulsion in der für den Menschen zu verwendenden Menge in die Vene injiziert, wohl nicht als die Ablagerung des Chaulmoograöls selbst zu betrachten, sondern auf die fettige Degeneration der Zellen zurückzuführen sei, und dass die andauernde Ablagerung des Chaulmoograöls ja unmöglich wäre, weil sich das Neutralfett in den Organen durch die lange Zeit wiederholten, subkutanen od. intravenösen Injektionen der neutralen Chaulmoograölemulsion in der für den Menschen zu verwendenden Dosis nicht vermehrt.

Wenn es so ist, steht es nun in Frage, welches Schicksal denn das Chaulmoograöl in den Organen bei der Injektion in grosser Menge erfahren könne? Auf diesem Gebiete sind aber bisher keine Arbeiten veröffentlicht worden. Bevor Verfasser an die Lösung dieser Frage ging, wurde der gegenwärtige Versuch vorgenommen, um zunächst darüber Klarheit zu schaffen, ob sich das in grosser Menge injizierte Chaulmoograöl in den verschiedenen Organen ablagert oder nicht.

### EXPERIMENT.

Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen gebraucht. Das frische Chaulmoograöl, (Fabrikat von Okamura) wurde nach



Verfassers eigener Methode raffiniert und emulgiert (1940 a). Die 5%ige Emulsion wurde den Tieren pro kg Körpergewicht je 10 ccm einmal intravenös injiziert. Nach dem Verlauf einer bestimmten Zeit wurden je an der Milz, der Leber, der Niere und der Lunge die Gesamtfettstoffe und das neutrale Chaulmoograöl bestimmt. Zur Bestimmung des Chaulmoograöls wurde Verfassers eigene Methode (1940 a) verwendet. Da es aber noch nicht bestätigt war, ob sie auch auf die Organe angewendet werden könne, wurde vorher ein präliminarer Versuch gemacht. Ich setzte nämlich der Mischung von Gewebepulver und Natriumsulfat anhydrid wieder 2 ccm der 5%igen Chloroformlösung des Chaulmoograöls (0,1 g) hinzu und machte mit diesem Mittel in der Weise, wie sie unten erwähnt wird, die Messung, deren Ergebnisse an der Milz 99,5%, am rechten Leberlappen 95,4%, am linken 102,5%, an der Niere 106,6% und an den Lungenlappen 102,9% waren. Dadurch wurde also sichergestellt, dass die kleine Menge Chaulmoograöl in einer grossen Menge von Organstücken messbar ist.

Auf dieser Grundlage wurde nun das folgende Verfahren angewendet: nachdem die mit der Chaulmoograölinjektion behandelten Kaninchen zu Tode verblutet waren, wurden ihnen die Organe exstirpiert. Sie wurden mit raffiniertem Schmirgel zu Gewebepulver zerrieben und pulverisiert durch die Entwässerungskraft des Natriumsulfatanhydrid. Von dem so verfertigten Pulver wurden die Gesamtfettstoffe mit der Soxhletschen Methode 12 Stunden lang in Äther ausgezogen und danach in den Kjeldahlkolben versetzt, um durch Abdampfung unter Niederdruck ausgetrocknet zu werden. Dann wurden sie in wasserfreiem Äther aufgelöst und die Lösung mit Asbest in den im voraus gewogenem Becher filtriert und nach der Entätherung die Gesamtfettstoffe gewogen. Dann wurde das Phosphatid in diesen Gesamtfettstoffen durch die Hinzufügung reinen Azetons zur Fällung gebracht. Nach gutem Umrühren wurde die Lösung mit entfetteter Baumwolle in den Kjeldahlkolben filtriert. Der Niederschlag wurde wiederholt mit Azeton gewaschen und, nachdem das Azeton im Kolben unter Niederdruck abgedampft worden war, in Petroläther (Siedepunkt 40°–60°) gelöst. Dann wurde diese Lösung mit

Asbest in einen im voraus gewogenen Becher filtriert, nach Abdampfung des Petroläthers, wurde der zurückgebliebenen Niederschlag (A g) gewogen. Nach Mischung mit einer kleinen Menge reinen Äthers wurde das Gemisch in ein Spitzglas von 20 cm, das an der Spitze halbkreisförmig ist, getan. Hierauf wurde im Vacuum entäthert, damit der Niederschlag sorgfältig und vollständig von dem Lösungsmittel befreit wurde. Dazu wurden a cem reine konz. Schwefelsäure tropfenweise aus der Bürette gefügt und sorgfältig, mit Eis kühlend, gemischt. Dann wurden sogleich  $\frac{1}{2}$  a cem 35%igen Formols hinein getan und gerührt. Diese Flüssigkeit wurde neutralisierte mit starkem Ammoniakwasser, bis der Niederschlag endlich ganz wie Eigelb gefärbt war. Darauf wurde mit Alkohol behandelt und nach Erwärmung und Rühren im Goochsehen Tiegel filtriert. Am Ende wurde mit warmen Alkohol, Wasser, Azeton, Petroläther und wasserfreiem Äther gewaschen, um alle Unreinigkeiten zu entfernen. Das Trocknen wurde bei 60°C fortgesetzt bis zur Gewichtskonstante. Mit  $\frac{4}{5}$  multipliziert, erhält man die Menge des Chaulmoograöls in den Versuchsorganen.

### *I. Die Milz (Tabelle I).*

Drei Stunden nach der intravenösen Injektion der Chaulmoograölemulsion nimmt die Menge der Gesamtfettstoffe stark zu und die Ablagerung des Chaulmoograöls ist deutlich zu bemerken. Obgleich sich diese Zunahme an den Gesamtfettstoffen noch nach dem Verlauf von 6 Stunden nachweisen lässt, gibt es hier doch keine Ablagerung des Chaulmoograöls. Wie schon berichtet [Koyanagi, (1940 a)], kann man nach dieser Methode, die eigentlich nur auf das neutrale Chaulmoograöl anwendbar ist, seine Fettsäure nicht bestimmen. Mit Rücksicht auf diese Tatsache darf man annehmen, dass die Zunahme der Gesamtfettstoffe, die sich auch nach Verlauf von 6 Stunden nach der Injektion des Chaulmoograöls bestätigen lässt, weniger die Ablagerung des Chaulmoograöls als Neutralfett als vielmehr als Fettsäure beweist. 12 Stunden nach der Injektion kann man das Vorhandensein des Chaulmoograöls in der Form der Fettsäure nachweisen.

TABELLE I.

Milz.

Nach Injekt. Stn.	Kaninchen Nr.	Injektions- menge g	Milz-Stück g	Gesamtfett- stoff %	Chaulmoog- gräöl g
1	1	1,1	1,75	2,377	0
	2	1,0	0,92	1,707	0
3	3	1,0	1,55	8,232	0,0969
	4	1,2	1,59	7,237	0,0709
6	5	1,1	0,95	5,518	0
	6	1,1	1,35	8,909	0
12	7	1,0	2,63	3,870	0
	8	1,0	0,85	2,235	0
24	9	1,0	1,15	1,330	0
	10	1,1	1,00	1,501	0
Nicht injiz.	11	—	0,76	1,460	—
	12	—	1,15	1,043	—
	13	—	0,87	1,724	—

*II. Die Leber (Tabelle II).*

An der Leber kann man feststellen, dass sich das Chaulmoograöl 3–6 Stunden später ablagert. Ferner kann die Zunahme der Menge der Gesamtfettstoffe noch 12 Stunden nach der Injektion konstatiert werden. Das beweist etwas später auftretende Ablagerung als bei der Milz. Dass die abgelagerte Menge des Chaulmoograöls in der Leber kleiner als in der Milz ist, ist wohl der Tatsache zuzuschreiben, dass die Leber, die ja in inniger Beziehung zum Fettumsatz steht, auch an der Zersetzung des Chaulmoograöls beteiligt war.

*III. Die Nieren und Lunge (Tabelle III und IV).*

An ihnen ist die Ablagerung des injizierten Chaulmoograöls nicht nachweisbar.

TABELLE II.

## Leber.

Nach Injekt. Stn.	Kaninchen Nr.	Injektions- menge g	Milz-Stück g	Gesamtfett- stoff %	Chaulmo- ograöl g
1	1	1,1	48,15	4,093	0
	2	1,0	41,44	3,466	0
3	3	1,0	44,62	4,018	0
	4	1,2	48,52	5,040	0,0109
6	5	1,1	51,10	3,952	0,0365
	6	1,1	55,13	3,372	0
12	7	1,0	38,84	5,301	0
	8	1,0	48,39	6,379	0
24	9	1,0	60,90	3,867	0
	10	1,0	38,95	3,570	0
Nicht injiz.	11	—	31,70	3,476	—
	12	—	53,05	3,763	—
	13	—	67,62	3,470	—

TABELLE III.

## Niere.

Nach Injekt. Stn.	Kaninchen Nr.	Injektions- menge g	Nieren-Stück g	Gesamtfett- stoff %	Chaulmo- ograöl g
1	1	1,1	14,55	2,369	0
	2	1,0	11,00	2,807	0
3	3	1,0	10,79	2,109	0
	4	1,2	12,21	2,449	0
6	5	1,1	16,05	1,903	0
	6	1,1	10,42	2,169	0
12	7	1,0	14,54	1,755	0
	8	1,0	12,54	2,377	0
24	9	1,0	11,90	2,192	0
	10	1,0	10,15	1,720	0
Nicht injiz.	11	—	11,65	1,878	—
	12	—	12,45	2,149	—
	13	—	12,92	2,399	—

TABELLE IV.

## Lunge.

Nach Injekt. Stn.	Kaninchen Nr.	Injektions- menge g	Milz-Stück g	Gesamtfett- stoff %	Chaulmoog- gräöl g
1	1	1,1	8,20	2,504	0
	2	1,0	5,95	2,324	0
3	3	1,0	7,40	2,736	0
	4	1,2	7,45	2,336	0
6	5	1,1	10,20	2,027	0
	6	1,1	6,87	3,197	0
12	7	1,0	6,45	3,158	0
	8	1,0	11,05	2,419	0
24	9	1,0	8,00	2,370	0
	10	1,1	5,60	1,910	0
Nicht injiz.	11	—	7,20	2,554	—
	12	—	7,61	2,387	—
	13	—	6,78	2,616	—

## SCHLUSS

Wenn das neutrale Chaulmooggräöl als Emulsion intravenös injiziert wird, so lagert es sich in der Milz, der Leber, insbesondere in ersterer stark ab. Jedoch kann die Ablagerung auch in diesen Organen nicht lange dauern.

## LITERATUR.

Koyanagi (1940 a): J. Biochem., **31**, 109.

Koyanagi (1940 b): J. Biochem., **32**, 317.



## STUDIUM ÜBER DAS BLUTPHOSPHATID.

### I. Mitteilung. Über die Beziehung zwischen den Serumphosphatiden und den Fraktionen des Serumeiweisses.

VON

TETUO HUKASAKO.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 13. November 1941)

Das Kolloidsystem des Serums besteht hauptsächlich aus Protein und Fettstoff: das Protein ist als hydrophiles Kolloidsystem bildend aufgefasst, aber unter den Fettstoffen gibt es Neutralfett, Cholesterin, Phosphatid usw., Stoffe von verschiedener Natur, deren Kolloidzustand auch voneinander sehr verschieden sein kann. Wenn das Eiweiss im Serum, einem Gemisch dieser Kolloidsysteme, auf gewöhnliche Weise ausfällt, so fällt auch der Fettstoff teilweise mit dem Eiweiss aus. Man kann das so auffassen, dass Eiweiss und Fettstoff sich aufeinander beziehen als Einnischung verschiedener Kolloidsysteme, oder dass beide Stoffe sich zu einem Kolloidsystem adsorbieren. Theorell (1930) glaubte, dass im Serum die Bestandteile nur gemischt sind, da das Eiweiss, das sich bei Sättigung mit Ammonsulfat niederschlägt, eine grosse Menge Fettstoff enthält, aber der Niederschlag, wenn wieder aufgelöst, sich vom Fettstoff ablöst. Chick (1914) behauptete, dass 2 Arten Globulin, wasserlösliches und salzlösliches, auf die Verschiedenheit der Fettstoffmenge zurückzuführen sind, weil die Löslichkeit des Komplexes von Globulin und Fettstoff von der Fettstoffmenge abhängt, und stellte durch Mischung der Emulsion des Phosphatids mit Pseudoglobulin künstlich Euglobulin her. Dies führte ihn zu der Meinung, dass Serumeuglobulin wohl ein Komplex von Pseudoglobulin und Fettstoff sei. Die Meinung und der Versuch von Chick wurde von Sørensen (1923) bestätigt, er behauptete

nämlich, dass Euglobulin die Verminderung der Löslichkeit und die Vermehrung des Phosphorgehalts zeigt, während Pseudoglobulin dagegen die Verminderung des P-Gehalts aufweist, wenn man das auf gewöhnliche Weise aus dem Serum niedergeschlagene Globulin auf verschiedene Weise fraktioniert und Euglobulin und Pseudoglobulin einzeln reinigt. Daraus ergibt sich, dass ein Teil der Phosphatide sich mit Euglobulin verbindet.

Es ist also eine wichtige Frage, zu untersuchen, in welchem Zusammenhang denn jede Fraktion des Serumeiweisses und das Phosphatid stehen, indem man das Serumeiweiss in Globulin und Albumin fraktioniert und dann subfraktioniert.

So will ich denn durch gleichzeitige Messung der Menge des Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH<sub>2</sub>-N die Lecithin- und Kephalinmenge im Serum und klar stellen, ob das Phosphatid, welches mit jeder Fraktion des Serumeiweisses verbunden ist, und welches bisher als Lecithin ( $P \times 25$ ) angesehen wurde, wirklich Lecithin ist, in welcher Beziehung denn Kephalin steht, in welchem Verhältnis Lecithin und Kephalin zueinander stehen.

#### EXPERIMENT.

*Das Experiment wird folgenderweise eingeteilt:*

1. Beobachtung über die Menge des aus Serum durch Alkohol-Äther (1:1) (A-Ä) extrahierbaren Phosphatids und über die Proportion von Kephalin und Lecithin in demselben.
2. In welchem Prozentsatz zum Gesamtphosphatid im Serum das Phosphatid mit dem Eiweiss ausfällt, wenn man das Serum mit Ammonsulfat sättigt und das Verhältnis von Kephalin und Lecithin im niedergeschlagenen Phosphatid.
3. Bestimmung der Menge des mit Globulin ausfallenden Phosphatids und des mit Albumin ausfallenden Phosphatids und dem Verhältnis von Kephalin und Lecithin in demselben zueinander.

#### VERSUCHSMETHODE.

Als Material wurde Pferdeserum verwendet. Im Schlachthof wurde das Blut, das aus der Halsvene eines Pferdes herausströmt,

in einen gereinigten Glaszylinder von ca. 1 l Inhalt aufgefangen und nach festem Aufsetzen eines Gummistopfens nach dem Laboratorium gebracht. Dann wurde es im Brutofen eine Zeitlang stehen gelassen, nach Gerinnung der Kuchen mit einem dünnen Glasstäbchen von der Zylinderwand entfernt und ein gelochtes Pressmetall vom ca. 350 g Gewicht in den Zylinder getan, um das Serum herauszickern zu lassen. Das herausgesickerte Serum wurde 30 Minuten lang (2000 Mal in der Minute) zentrifugiert und klares, gelbliches Serum gewonnen.

Die Fraktionierung des Serumproteins erfolgt nach Lustig (1930), nämlich Gesamteiweiss fällt durch Sättigung mit Ammonsulfat, Globulin durch Halbsättigung und aus dem Filtrat Albumin durch Ammonsulfat-Sättigung aus. Dies alles sei noch eingehender beschrieben: man gibt ins Serum destilliertes Wasser von gleicher Menge hinein, sättigt es mit krystallisiertem Ammonsulfat und lässt dann 24–48 Stunden stehen. Man filtriert, wäscht den Niederschlag des Eiweisses mit gesättigter Ammonsulfatlösung 3 mal und gewinnt so das Gesamteiweiss. Zur Fraktionierung des Serumproteins in Globulin und Albumin fügt man dem mit destillierten Wasser auf die doppelte Menge verdünnten Serum gesättigte Ammonsulfatlösung (sie wird durch Ammon  $\text{pH}$  7,2–7,5 gemacht, weil die beiden Fraktionen nicht den gleichen isoelektrischen Punkt haben.) von gleicher Menge bei und lässt es 24–48 Stunden stehen. Den Niederschlag des Globulins wäscht man mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung ( $\text{pH}$ : 7,2–7,5 gemacht) einigemal, bis das Filtrat keine Eiweissreaktion mehr zeigt. Dieses Filtrat sättigt man dann ebenfalls, wie beim Gesamteiweiss, mit krystallisiertem Ammonsulfat und behandelt es in gleicher Weise weiter, um Albumin zu gewinnen.

Auszug des Fettstoffes: Zu direkter Extraktion des Fettstoffes aus dem Serum kocht man den mit A-Ä. ausgezogenen Extrakt nach Endo'scher Methode (1928) einige Minuten auf, filtriert nach dessen Abkühlung in einen Kjeldahl'schen Kolben, trocknet bei niedriger Temperatur unter Minderdruck ab, löst in wasserfreiem Äther und filtriert dann durch ein Asbestfilter. Zur Bestimmung braucht man diese Äther-Lösung.

Zur Extraktion des Fettstoffes aus dem Proteinniederschlag trägt man diesen Niederschlag in einen Becher vollständig über, fügt ihm eine kleine Menge von A-Ä. bei, knetet ihn mit einem Glasstäbchen, so wird die breiige Masse durch Entwässerung grob sandig. Man giesst den Obersatz in einen Myerkolben ab, dem Niederschlag fügt von neuem A-Ä. hinzu, wiederholt dieses Verfahren einigemale, bis der Niederschlag feinsandig ist, den man dann mit der Mutterlösung in den Meyerkolben überträgt. Dann folgt Kochen, Filtrieren, Trocknen, Lösen mit wasserfreiem Äther, wie beim obigen Fall.

Zur Bestimmung des Lipoid-N filtriert man die wasserfreie Ätherlösung in einen Kjeldahlkolben und verfährt damit nach Abdampfung des Äthers nach der Mikro-Kjeldahl'schen Methode.

Zur Bestimmung des Lipoid-Amino-N filtriert man den Ätherextrakt in ein von Takata (1936) angegebenes Zentrifugalrohr, fügt ihm nach Abdampfung des Äthers Alkohol zu, löst das Lipoid durch Erhitzung, emulgiert es mit Wasser und bestimmt es nach der von Nakashima (1932) verbesserten, Van Slyke'schen Amino-N-Bestimmungsmethode.

Zur Bestimmung des Lipoid-P füllt man den Ätherextrakt in einen Myerkolben, oxydiert ihn nach Abdampfung des Äthers nach Koyanagi'scher Methode (1939) mit konzentrierter Schwefelsäure, trennt mit Ammoniumnitrat und Ammoniummolybdat den gelben Niederschlag von Ammoniumphosphomolybdat, entfernt die Säure durch Waschen mit kaltem Wasser, titriert mit  $n/25$  NaOH, titriert mit  $n/25$   $H_2SO_4$  zurück und errechnet dann aus der Verbrauchsmenge von  $n/25$  NaOH die Menge von Lipoid-P.

Bestimmung des Protein. Bei direkter Behandlung des Serum mit A-Ä. lost man den Eiweissniederschlag nach Verschwinden des A-Ä.-Geruchs in Wasser und bestimmt N nach der Mikro-Kjeldahl'schen Methode. Bei dem durch Ammonsulfat gefällten Eiweiss löst man es in verdünntem NaOH (2-3%), um den schwerlöslichen Niederschlag zu lösen und das Ammonium zu vertreiben, trägt einen Teil dieser Lösung in einen Kjeldahl'schen Kolben über, fügt ihm eine ca. 5fache Menge Alkohol bei und vertreibt das Ammon, unter Erwärmung auf dem Wasserbad,

durch eine Wasserpumpe. Setzt man die Grenze so, dass das durch Beifügung des Alkohols gefällte Eiweiss durch teilweise Abdampfung des Alkohols durchsichtig gelöst bleibt, so kann, nach Verfassers Erfahrung, das Ammon vollständig vertrieben werden, ohne dass man Eiweiss-N verliert, aber wenn das Eiweiss über diese Grenze hinaus zum Trocknen kommt, so vermindert es sich sehr wesentlich.

#### ERGEBNISSE DES VERSUCHS.

1. Phosphatid, das unmittelbar aus dem Serum extrahiert wurde, und Phosphatid, das aus dem durch Sättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagenen Serumprotein extrahiert wurde:

Direkter Extrakt aus dem Serum: 5,0 ccm Serum kocht man in ca. 400 ccm A-Ä. eine kurze Zeit, filtriert es nach Abkühlung in einen Messkolben von 500,0 ccm, füllt den Kolben mit der Waschlösung. Zur Bestimmung von N und Amino-N fängt man von der A-Ä-Lösung je 50,0 ccm auf und zur Bestimmung von P 20,0 ccm. Dies wird, wie oben, nach Trocknen, Auszug mit wasserfreiem Äther der Bestimmung unterzogen. Umgerechnet in Serum, hat man zur Bestimmung von N und Amino-N 5,0 ccm und zur Bestimmung von P 2,0 ccm gebraucht.

Phosphatid, das aus dem durch Sättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagenen Eiweiss extrahierbar ist: 100,0 ccm Serum fügt man 100 ccm destilliertes Wasser und dann 150 g krystallisiertes Ammonsulfat bei und vermischt gut. Am folgenden Tage filtriert man, extrahiert den Niederschlag nach der obigen Methode mit ca. 400 ccm A-Ä. Lösung. Zur Bestimmung von N und Amino-N gebraucht man 50,0 ccm davon und zur Bestimmung von P 20,0 ccm. In Serum umgerechnet, zur Bestimmung von N und Amino-N 10,0 ccm und zur Bestimmung von P 4,0 ccm. Die Ergebnisse sieht man in. Tabelle I, (A: Das Phosphatid durch direkten Extrakt aus dem Serum, B: Das Phosphatid aus dem durch Sättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagenen Eiweiss).

Lipoid-P im Durchschnitt von 6 Fällen beträgt A: 9,28 mg/dl, B: 7,89 mg/dl, und 85% von Lipoid-P im Serum schlägt mit Eiweiss durch Sättigung mit Ammonsulfats nieder.



TABELLE I.

Versuch	Gesamteiweise		Lipoid-P			Lipoid-N			Lipoid-NH <sub>2</sub> -N			Lip.-NH <sub>2</sub> -N Lip.-N × 100	
	A	B	A	B	$\frac{B}{A} \times 100$ %	A	B	$\frac{B}{A} \times 100$ %	A	B	$\frac{B}{A} \times 100$ %	A	B
	g	g	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	%	%
1 { S E	6.15	6.13	8.98 1.29	7.82 1.27	87.0	6.45 1.04	4.73 0.77	73.3	2.59 0.42	1.88 0.30	72.5	39.9	39.7
2 { S E	5.99	5.80	8.27 1.38	7.05 1.21	85.2	5.25 0.87	3.74 0.64	71.2	2.34 0.39	1.84 0.31	78.6	44.5	49.1
3 { S E	6.27	5.88	9.02 1.43	7.45 1.26	82.5	5.60 0.89	5.06 0.86	90.3	2.21 0.35	1.70 0.28	76.9	39.4	33.5
4 { S E	6.39	6.39	9.40 1.47	8.07 1.24	85.5	6.80 1.06	6.71 1.05	98.6	3.15 0.49	2.21 0.34	70.1	46.3	32.9
5 { S E	7.08	6.84	10.75 1.51	9.10 1.33	85.0	8.60 1.27	6.93 1.01	80.5	4.01 0.58	3.46 0.50	86.2	46.6	49.9
Mittel { S E	6.37	6.20	9.28 1.45	7.89 1.27	85.0	6.54 1.01	5.43 0.96	83.0	2.86 0.44	2.21 0.35	76.9	43.7	40.7

S.....per 100.0 ccm Serum.  
E.....per 1.0 g Serumweis.

Lipoid-N beträgt A: 6,54 mg/dl und B: 5,43 mg/dl, 83% von Lipoid-N fällt mit dem Eiweiss aus.

Lipoid-Amino-N beträgt A: 2,86 mg/dl und B: 2,21 mg/dl, 76% von Lipoid-Amino-N fällt mit dem Eiweiss aus. Lipoid-Amino-N ist in Lipoid-N in folgendem Verhältnis enthalten: A: 43% und B: 40%.

Phosphatid im Serum, als Lipoid-P dessen 85%, als Lipoid-N dessen 83%, fällt mit dem Eiweiss durch Sättigung mit Ammonsulfat aus, und kann mit A-Ä ausgezogen werden.  $\frac{\text{Kephalin}}{\text{Lecithin}}$  beträgt A: 0,437 und B: 0,407.

2. Phosphatid, das mit Globulin ausfällt, und Phosphatid, das mit Albumin ausfällt:

Zur Fraktionierung von Globulin und Albumin gebraucht man 200,0 ccm Serum. Von 500,0 ccm A-Ä-Extrakt jeden Niederschlages gebraucht man zur Bestimmung von N und Amino-N 50,0 ccm und zur Bestimmung von P 20,0 ccm, d. h., in Serum umgerechnet, gebraucht zur Bestimmung von N und  $\text{NH}_2\text{-N}$  20,0 ccm und zur Bestimmung von P 8,0 ccm.

Serum-Globulin beträgt 4,07 g/dl, Albumin, 3,02 g/dl. Das Verhältnis von Globulin zu Albumin beträgt 1,34.

Lipoid-P im 100 ccm Serum beträgt 7,91 mg in Albumin-Fraktion und 3,42 mg in Globulin-Fraktion, d. h. 30% Phosphatid fällt mit Globulin und 70% mit Albumin aus. Umgerechnet in 1 g Eiweiss, schlägt 0,82 mg Globulin und 2,63 mg Albumin nieder.

Lipoid-N beträgt 2,48 mg/dl in Globulin-Fraktion, 4,93 mg/dl in Albumin-Fraktion, also 33% von Lipoid-N fällt mit Globulin aus, und 67% mit Albumin. Umgerechnet in 1 g Eiweiss, beträgt Globulin 0,60 mg, Albumin 1,63 mg.

Lipoid-P und Lipoid-N sind sowohl absolut als auch relativ mehr in Albumin auffindbar.

Lipoid-Amino-N beträgt 1,09 mg/dl in Globulin-Fraktion und 1,19 mg/dl in Albumin-Fraktion; umgerechnet in 1 g Eiweiss, beträgt Globulin 0,26 mg, Albumin 0,39 mg/dl.

$\frac{\text{Lipoid-N}_2\text{H-N}}{\text{Lipoid-N}}$  beträgt in Globulin 0,44, in Albumin 0,24. Lipoid-Amino-N überwiegt quantitativ in Albuminphosphatid, aber pro-

TABELLE II.

Versuch	Eiweiss		Lipoid-P			Lipoid-N			Lipoid-Amino-N			$\frac{\text{Lip.-Amino-N}}{\text{Lip.-N}} \times 100$	
	Glob. g	Alb. g	Gl. mg	Al. mg	$\frac{\text{Gl.}}{\text{Al.}}$	Gl. mg	Al. mg	$\frac{\text{Gl.}}{\text{Al.}}$	Gl. mg	Al. mg	$\frac{\text{Gl.}}{\text{Al.}}$	Gl. mg	Al. mg
1 { S E	3.83	2.73	2.21	6.25	0.35	1.37	4.33	0.31	0.84	1.06	0.79	68.4	22.1
			0.57	2.28		0.35	1.58		0.21	0.38			
2 { S E	3.89	2.80	3.05	8.62	0.35	2.75	4.96	0.55	1.11	1.33	0.83	40.3	26.8
			0.78	3.07		0.70	1.77		0.25	0.47			
3 { S E	4.34	2.99	3.32	8.57	0.44	2.84	5.05	0.56	1.11	1.28	0.86	39.0	25.3
			0.86	2.86		0.65	1.68		0.25	0.42			
4 { S E	3.95	2.90	3.32	7.80	0.42	2.35	4.50	0.52	0.95	1.09	0.87	40.4	24.2
			0.84	2.68		0.59	1.55		0.24	0.37			
5 { S E	4.37	3.71	4.72	8.32	0.56	3.13	5.85	0.53	1.45	1.22	1.18	46.7	20.8
			1.08	2.24		0.71	1.57		0.33	0.32			
Mittel { S E	4.07	3.02	3.42	7.91	0.43	2.48	4.93	0.50	1.09	1.19	0.91	44.0	24.1
			0.82	2.63		0.60	1.63		0.26	0.39			

S.....per 100,0 cem Serum.

E.....per 1,0 g Serumweis.

portionell in Globulinphosphatid.

3. Phosphatid, das mit dem durch Ammonsulfat-Sättigung gefällten Eiweiss nicht niederschlägt:

In dem vorhergehenden Experiment wurde klar gestellt, dass das Phosphatid, das durch Ammonsulfat-Sättigung mit Eiweiss ausfällt, 85% vom Phosphatid beträgt, das aus dem Serum unmittelbar ausgezogen werden kann. Im folgenden Experiment wurde festgestellt, ob die restlichen 15% Phosphatid durch Ammonsulfat-Sättigung nicht ausfällt, sondern ins Filtrat übertragen wird, oder ob es zwar in Wirklichkeit ausfällt, aber wegen der Beimischung von Ammonsulfat durch A-Ä. nicht vollständig ausgezogen werden kann.

Der unmittelbar aus dem Serum durch A-Ä. ausgezogenen Niederschlag des Lipoids wurde zuerst oxydiert und die P-Menge gemessen, anderseits aber wird der Niederschlag durch HCl-Pepsin-Lösung verdaut, mit A-Ä. ausgezogen und das Lipoid-P wird gemessen. Wenn das Serum durch Ammonsulfat niederschlägt, so wird das Lipoid aus dem Filtrat durch A-Ä. ausgezogen und die P-Menge wird gemessen. Der Niederschlag aber wird, wie oben, einerseits unmittelbar oxydiert und die P-Menge wird gemessen, anderseits wird er durch HCl-Pepsin-Lösung verdaut, durch A-Ä. ausgezogen und das Lipoid-P wird gemessen. Das Verfahren des Experiments ist kurz gefasst folgendes:

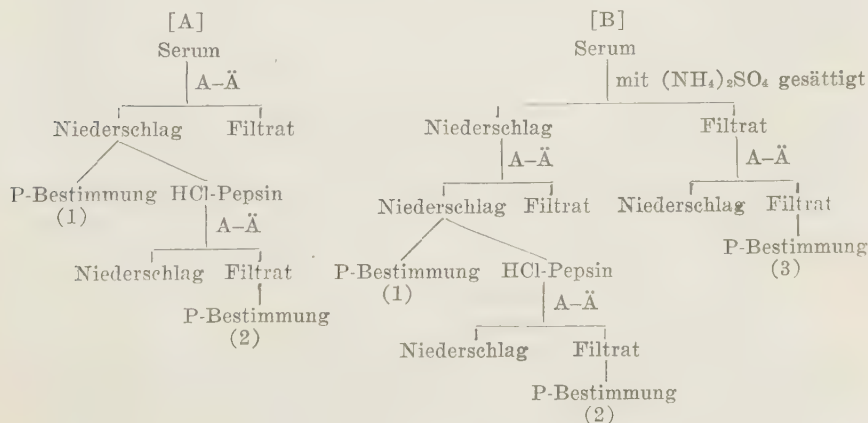


TABELLE III.

Versuch	[A]		[B]		
	1	2	1	2	3
1	4.21	0.019	0.91	0.02	1.14
2	3.51	spur	0.56	spur	0.81
3	3.98	spur	0.65	spur	0.95
4	4.22	0.008	0.82	spur	1.18
5	3.84	spur	0.54	spur	0.84
Mittel	3.95	—	0.70	—	0.98

Wenn man das Phosphatid aus dem Serum durch A-Ä. extrahiert, so gewinnt man den Rückstand des Serums, welcher, wie in Tabelle aufgewiesen, durchschnittlich 3,95 mg P enthält. Aber der Niederschlag, der zuerst durch HCl-Pepsinlösung verdaut und dann durch A-Ä ausgezogen wurde, ist nach der Koyanagi'schen Methode (1939) schwer zu bestimmen oder gar nicht bestimmbar. Der Wert 3,95 mg/dl zeigt also wohl die Menge des anorganischen Phosphors im Serum.

Bei Ammonsulfat-Sättigung enthält der A-Ä-Extrakt des Serumeiweisses, umgerechnet in 100 ccm Serum, durchschnittlich 0,70 mg P, dies ist wohl nur ein Teil dessen, das als anorganischer Phosphor im Serum vorhanden ist, aber durch Ammonsulfat-Sättigung mit Eiweiss niederschlägt. P im Filtrat des Niederschlags, der aus 100 ccm Serum durch Ammonsulfat-Sättigung gewonnen ist, beträgt 0,98 mg, eine Menge, die übereinstimmt mit der Menge des Lipoid-P, das, wie in Tabelle I, durch Ammonsulfat-sättigung nicht mit dem Eiweiss niederschlägt (durchschnittlich 1,09 mg). Bei Ammonsulfat-Sättigung des Serums schlägt das ca. 15% Phosphatid nicht mit dem Eiweiss nieder, sondern bleibt im Filtrat zurück.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Handovsky und andere (1925) haben das Rinderserum mit Ammonsulfat fraktioniert und die Menge des Cholesterins und Phosphatids jeder Fraktion bestimmt. Seiner Meinung nach ver-



bindet sich Serum-Cholesterin zu 25% mit Globulin, 75% mit Phosphatid, und das Serumphosphatid schlägt fast vollständig mit Albumin nieder. Theorell (1926) hat das Pferdeplasma mit Ammonsulfat fraktioniert und Cholesterin und Lecithin (Äther-löslicher Phosphor  $\times 25$ ) bestimmt; was betreffs des Cholesterins mit dem Ergebnis des Handovsky'schen Experiments fast übereinstimmt, aber er glaubte dem Ergebnis von Handovsky nicht, dass das Phosphatid gar nicht mit Globulin ausfällt, weil er wusste, dass die Fällungen 19% Lecithin mit Fibrinogen, 19% mit Globulin und der restlichen 62% mit Albumin zusammen stattfindet. Turner u. Gibson (1932) haben an Serum und Plasma von Menschen, Hund und Pferd den Verbindungszustand des Eiweisses mit dem Fettstoff untersucht und berichtet, dass der Niederschlag des Gesamteiweisses, ganz allgemein bei allen Tieren, etwa die Hälfte der Lipoidmenge des Serums oder Plasmas enthält, dass Globulin immer eine grössere Menge Lipoid enthält als Albumin, und dass unter Lipoiden, die mit Globulin ausfallen, Phosphatid im höchsten Prozentsatz steht.

Das Ergebnis meines Experiments stimmt mit dem von Theorell fast überein, dass nämlich die Menge des Phosphatid, das beim Ausfällen des Pferdeserumproteins niederschlägt, 85% vom Gesamtserumphosphatid beträgt, und das restliche Phosphatid im Filtrat zurückbleibt, dass 30% des mit Eiweiss niederschlagenen Phosphatids mit Globulin und 70% mit Albumin ausfällt, dass das Verhältnis des Globulins zu Albumin betreffs des Pferdeserums 1.34 beträgt, und dass das Phosphatid, das in 1 g Eiweiss auffindbar ist, im Albumin von grösserer Menge ist.

Betreffs  $\frac{\text{Kephalin}}{\text{Lecithin}}$  der Eiweissfraktion findet sich noch keine Mitteilung, aber aus meinem Experiment ergibt sich, dass  $\frac{\text{Kephalin}}{\text{Lecithin}}$  des Pferdeserums 0,75 beträgt, dessen Verhältnis im Niederschlag des Eiweisses durch Ammonsulfat-Sättigung 0,66, in der Globulin-Fraktion 0,78 und in der Albumin-Fraktion 0,31.

#### LITERATUR.

Chick (1914): Biochem. J., 8, 404.

Endo (1928): J. Juzen, Med. Soc., 33, 1892.

- Handovswy, Lohmann u. Bosse (1925): Pflüger Archiv., **210**, 63.  
Kojanagi (1939): J. Biochem., **28**, 371.  
Lustig (1930): Biochem. Z., **225**, 247.  
Nakashima (1932): J. Jusen Med. Soc., **37**, 2176.  
Sørensen (1923): Compt rendus du Laboratoire Carlsberg, **15**, 11.  
Takata (1936): J. Biochem., **24**, 153.  
Theorell (1926): Biochem. Z., **175**, 297.  
Theorell (1930): Biochem. Z., **223**, 1.  
Turner u. Gibson (1932): J. Clin. Invest., **11**, 735.

## BEMERKUNGEN ÜBER DIE KOLORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES VITAMIN B<sub>1</sub> IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN GEWEBEN.<sup>1)</sup>

VON

AKIJI FUJITA UND DANJI MATSUKAWA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato Instituts  
zu Tokyo.)

(Eingegangen am 16. November 1941)

Wir haben schon eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Vitamin B<sub>1</sub> in tierischen und pflanzlichen Geweben ausführlich beschrieben (Fujita und Matsukawa 1941). Nach fortgesetzten Untersuchungen haben wir gefunden, dass man bei Harn die etwas umständliche Extraktion des eingeeengten Auszuges durch Methanol bzw. Benzylalkohol umgehen kann und die Ausführung vereinfachen kann, indem man ihn im voraus durch Isobutanol bzw. Amylacetat extrahiert. Weiterhin sind wir überzeugt, dass man den Gesamtaneuringehalt auch bei tierischen Geweben meistens<sup>2)</sup> nach „Takadiastase“-Wirkung ohne Extraktion durch Methanol bzw. Benzylalkohol bestimmen kann, indem man den Auszug nach *eventueller* Vorextraktion durch Amylacetat bzw. Isobutanol direkt an Kieselgur adsorbieren lässt.

Im folgenden beschreiben wir den vereinfachten und verbesserten Arbeitsgang, mit dem man den Aneuringehalt in manchen Geweben praktisch bequemer bestimmen kann.

### I. BESTIMMUNG DES ANEURINGEHALTS IM HARN.

*Vorschrift.* 50,0 cem Harn werden mit 1*n* HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. NaOH auf P<sub>H</sub> etwa 4,5 eingestellt. Bei Zusatzversuch gibt man ausserdem 40 γ Aneurin. Nach Zusatz von 10 cem Isobutanol bzw.

---

1) Der Gesellschaft „Nippon Gakuzyutu-Sinzôkai“ danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

2) Es gibt aber Ausnahmen wie z. B. Auster.

Amylacetat erwärmt man die Lösung 5 Minuten auf 80°, und schüttelt 2 Minuten kräftig. Nach Abkühlen wird zentrifugiert. Die überstehende Schicht ist gewöhnlich rotbraun. Mit einer Pipette nimmt man die untere Wasserschicht, die durch Isobutanol bzw. Amylacetat wieder wie oben extrahiert wird. Die untere Wasserphase wird herauspipettiert, mit Wasser auf etwa 500 ccm aufgefüllt,<sup>1)</sup> mit 0,4 g Kieselgur versetzt, geschüttelt und filtriert. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen und der Aneuringehalt vorschriftsmässig bestimmt.

*Bemerkungen.* (1) Ohne Vorextraktion wird die Bestimmung beim Harn unmöglich, da die ganze Xylolschicht sich in eine kolloidale Scheibe verwandelt und sich keine klare flüssige Phase trennen lässt.

(2) Der  $f$ -Wert beträgt gewöhnlich 180 bis 200. Bei Amylacetat ist der Wert gewöhnlich um 10% kleiner als bei Isobutanol.

(3) Wenn man den Auszug, dem Natriumsulfat bis auf 10% zugesetzt worden ist, durch Isobutanol bzw. Amylacetat extrahiert, so wird die Farbenreaktion um etwa 30% gehemmt.

(4) Wenn man den Harn, auch nach Vorextraktion, über Nacht im Eisschrank liegen lässt, so können manchmal rotbraune Niederschläge<sup>2)</sup> entstehen. Wenn man das Kieselguradsorbat zusammen mit diesen Krystallen untersucht, so kann die Farbenreaktion bedeutend gehemmt werden. Der Extrakt muss daher vor der Kieselguradsorption durch Zentrifugieren oder Filtration von diesen Niederschlägen befreit werden.

*Beispiel.*

Hauptversuch:  $E=0,045$ . Zusatzversuch:  $E'=0,265$ .

$$f = \frac{40}{0,265 - 0,045} = 182. \quad x = 0,045 \cdot 182 \cdot 100/50 = 16,4\%.$$

## II. BESTIMMUNG DES FREIEN ANEURINS IN TIERISCHEN GEWEBEN.

Zur Bestimmung des richtigen freien Aneuringehaltes muss

1) Ohne diese Verdünnung wird die Farbenreaktion beim Harn bedeutend (etwa 60%) gehemmt und der gelbe Farbstoff geht in die Xylolschicht über.

2) Möglicherweise handelt es sich um braungefärbte Harnsäurekrystalle.

man die Gewebephosphatase durch vorheriges Erwärmen inaktivieren. (Vgl. Fujita, Dohi und Kawati 1942).

*Vorschrift.* Eine geeignete Menge Wasser wird im voraus auf 80° erwärmt. Darin gibt man *m* g Gewebestückchen und lässt mindestens 15 Minuten stehen. Die Gewebestückchen werden im Mörser mit Glassand fein zerrieben. Nach Zusatz von Wasserextrakt, einer geeigneten Menge HCl und Wasser bis auf 5 *m* cem (PH etwa 4,5) wird die Suspension gut gerührt. Nach 15 Minuten langem Erwärmen auf 80°, unter öfteren Umschütteln, kühlt man die Lösung ab, ersetzt das abgenommene Wasser und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit ist gewöhnlich klar. Man erhält dadurch den Auszug (1:5). Bei vielen Geweben kann man den Aneuriegehalt dadurch bestimmen, dass man den Auszug direkt adsorbieren lässt.<sup>1)</sup> In manchen Fällen, wie bei Leber und Nebenniere des Rindes, Muskel des Huhns usw. erstarrt die ganze Xylolschicht scheibenartig und die Bestimmung wird unmöglich. Dann muss unsere Methanol- oder Benzylalkoholmethode angewandt werden. In manchen Fällen, wie bei Hoden und Herzmuskel des Rindes wird die Xylolschicht teilweise scheibenartig. Dann wird die Xylolschicht einschliesslich der scheibenartigen Masse in ein kleines Zentrifugengefäss gebracht und nach Verstöpseln stark zentrifugiert. Man kann dadurch die nötige Menge Xylolschicht nehmen.

*Bemerkungen.* (1) Bei fettreichen Geweben, wie Muskel des Walfisches können die Fette nach Zentrifugieren des Extraktes an der Oberfläche schweben.<sup>2)</sup> Zur Bestimmung wird die Wasserschicht allein abpipettiert.

(2) Bei schwer zerreibbaren Geweben, wie z. B. Skelettmuskel, Magen und Darm von Rind und Pferd, werden diese nach Erwärmen auf 80° mit einer Schere fein zerschnitten und mit Glaspartikelchen zerrieben.

(3) Auch bei tierischen Geweben nehmen die *E*-Werte pro-

---

1) Gewöhnlich ist die Verdünnung wie beim Harn entbehrlich. Bei der Methanolmethode ist die Verdünnung manchmal günstiger. Bei Rinderleber war der *f*-Wert des Filtrats(1:10) etwa die Hälfte von dem des Filtrats(1:5).

2) Bei pflanzlichen Geweben war es bei „Daizu“-Bohnen der Fall.

portional der zugesetzten Aneurinmenge zu.<sup>1)</sup>

(4) Der Extrakt mit reichlichen gelatineartigen Substanzen wie bei Haut von „Namazu“ (*Parasilurus asotus* L.) und „Unagi“ (*Anguilla japonica* Temm. et Schl.) gerinnt im Eisschrank. Im solchen Fällen muss der Extrakt vor der Adsorption durch Erwärmen auf etwa 30° gelöst werden.

*Beispiele.* (1) Muskel einschliesslich Haut von „Huna“ (*Carassius auratus* L.).

50 ccm Extrakt (1:5, klar, P<sub>H</sub> 4,7, entsprechend 10 g Gewebe) werden zu einem Versuch verwendet. Im Zusatzversuch wurden 20 γ Aneurin zugesetzt. Durch direkte Adsorption bestimmt. Xylolschicht trennt sich sehr gut.

$$E=0,055. \quad E'=0,210. \quad f=\frac{20}{0,210-0,055}=129.$$

$$x=0,055 \cdot 129 \cdot 100/10=71,0 \gamma \text{ \%}.$$

Ähnlich verhalten sich die meisten Fischmuskeln, Muskel, Magen, Darm und Lunge des Rindes sowie fast alle pflanzlichen Gewebe.

(2) Leber des Rindes.

50 ccm Extrakt (1:5, gelb, getrübt, P<sub>H</sub> 4,7, entsprechend 10 g Gewebe) werden behandelt. Zur Bestimmung des freien Aneurins ist die direkte Adsorption unzweckmässig, da die ganze Xylolschicht scheibenartig erstarrt. Durch Methanolmethode bestimmt. Bei der Adsorption wurde der Methanolextrakt mit Wasser aufs 10fache verdünnt.

$$E=0,107. \quad E'=0,250. \quad f=\frac{20}{0,250-0,107}=140.$$

$$x=0,107 \cdot 140 \cdot 100/10=150 \gamma \text{ \%}.$$

Ähnlich verhalten sich Muskel des Schweins und des Huhns und Nebenniere des Rindes.

---

1) Durch Versuche mit Zusatz von bis 40 γ Aneurin zu Rinderniere, bei der die Farbenreaktion ziemlich gehemmt wird ( $f=206$ ), wurde dies festgestellt.



### III. BESTIMMUNG DES GESAMTANEURINGEHALTES IN TIERISCHEN GEWEBEN.

Nach Einwirkung der „Takadiastase“ ist die Bestimmung durch direkte Adsorption bei den meisten tierischen Geweben ebensogut wie bei den pflanzlichen möglich. Dabei entstehen aber manchmal xylollösliche gelbliche Farbstoffe, die im voraus durch Amylacetatextraktion beseitigt werden sollen.<sup>1)</sup> Es entstehen manchmal nach der Einwirkung der „Takadiastase“ flockige Niederschläge, wie bei Milz, Herzmuskel, Skelettmuskel und Leber des Rindes, einigen Fischmuskeln und anderen meist trüben Gewebeextrakten. Manchmal schwebt die Fettmasse auf der Oberfläche der Flüssigkeit, wie z. B. bei Muskel des Walfisches. In solchen Fällen führt man die Adsorption an Kieselgur erst nach Beseitigung der Masse durch Zentrifugierung oder Filtration.<sup>2)</sup>

*Beispiele.* (1) Grosshirn des Rindes.

50 ccm Extrakt (1:5, P<sub>H</sub> 4,5, gelblich klar, entsprechend 10 g Gewebe) werden mit 1,0 ccm „Takadiastase“-Lösung (1:10) und etwa 10 Tropfen Toluol versetzt und über Nacht bei 38° aufbewahrt. Durch 10 ccm Amylacetat bei 80° vorextrahiert, abgekühlt und zentrifugiert. Die Lösung war klar und gelblich. Nach Adsorption an Kieselgur wurde vorschriftsmässig bestimmt.

$$E=0,085. \quad E'=0,355. \quad f = \frac{40}{0,355-0,085} = 148.$$

$$x=0,085 \cdot 148 \cdot 100/10=126 \gamma \%$$

(2) Herzmuskel des Rindes.

50 ccm Extrakt (1:5, P<sub>H</sub> 4,5, klar, braun, entsprechend 10 g Gewebe) werden behandelt. Nach Bebrütung entstanden Niederschläge, die abgenutscht wurden. Das Filtrat war gelblich und klar.

$$E=0,285. \quad E'=0,422. \quad f = \frac{20}{0,422-0,285} = 146.$$

---

1) Bei Rinderleber entstand in der Xylolschicht manchmal eine scheibenartige Masse, die sich aber durch Vorextraktion mittels Amylacetat meistens beseitigen liess.

2) Verdünnung der Flüssigkeit ist gewöhnlich unnötig.

$$x=0,285 \cdot 146 \cdot 100/10=416\gamma \%$$

(3) Auster (*Ostrea laperousei* Thunberg).

50 ccm Extrakt (1:5, P<sub>H</sub> 4,4, sehr getrübt, gelblich, entsprechend 10 g Material) werden behandelt. Nach Bebrütung wurde durch Isobutanol vorextrahiert, da der Extrakt sehr reichlich toluollösliche gelbe Farbstoffe enthält. Durch Methanolmethode bestimmt.

$$E=0,122. \quad E'=0,265. \quad f=\frac{20}{0,265-0,122}=140.$$

$$x=0,122 \cdot 140 \cdot 100/10=171\gamma \%$$

#### IV. VORBEHANDLUNG ZUR BESTIMMUNG DES ANEURINGEHALTES IN PFLANZLICHEN GEWEBEN, DIE SEHR REICHLICHE XYLOLLÖSLICHE FARBSTOFFE ENTHALTEN.

In diesem Falle kann man den Zweck dadurch erreichen, dass man die adsorbierte Kieselgursuspension durch Isobutanol bzw. Amylacetat extrahiert. (Vgl. Fujita und Matsukawa 1941). Es ist aber ebensogut oder manchmal noch bequemer, dass man die Vorextraktion des Auszuges vor der Adsorption ausführt.

*Beispiele.* (1) Wurzel von „Ninjin“ (*Daucus Carota* L. var. *sativa* DC).

50 ccm Extrakt (1:5, orangerot, sehr getrübt, P<sub>H</sub> 4,7, entsprechend 10 g Material) werden mit 1,0 ccm „Takadiastase“-Lösung (1:10) und 10 Tropfen Toluol versetzt. Nach Bebrütung wird die Lösung durch 10 ccm Amylacetat dreimal vorextrahiert. Der dritte Extrakt war farblos. Weiter wurde vorschrittmässig bestimmt.

$$E=0,082. \quad E'=0,365. \quad f=\frac{40}{0,365-0,082}=141.$$

$$x=0,082 \cdot 141 \cdot 100/10=116\gamma \%$$

(2) Blatt von „Daikon“ (*Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Makino).

50 ccm Extrakt (1:5, etwas getrübt, P<sub>H</sub> 4,7, entsprechend 10 g Material) werden behandelt. Einmalige Extraktion durch Amylacetat. Durch direkte Adsorption bestimmt.

$$E=0,030. \quad E'=0,360. \quad f=\frac{40}{0,360-0,030}=121.$$

$$x=0,030 \cdot 121 \cdot 100/10=36,4\gamma \text{ \%}.$$

V. VORBEHANDLUNG ZUR BESTIMMUNG DES ANEURINGEHALTES  
IN PFLANZLICHEN GEWEBEN, DIE REICHLICH STÄRKE  
ODER SCHLEIMSTOFFE ENTHALTEN.

In diesem Falle muss die kolloidale Masse durch Methanolfällung beseitigt werden. Bei Gegenwart der Stärke wird der Extrakt nach Einwirkung der „Takadiastase“ gespalten und die Zähigkeit der Lösung ging verloren.

*Beispiel.* (1) Wurzel von „Nagaimo“ (Dioscorea Batatas Deene).

60 g Material werden nach Inaktivierung der Phosphatase vorschriftsmässig zerrieben und nach Zusatz einer geeigneten Menge HCl und Wasser bis auf 300 ccm extrahiert. Die ganze Flüssigkeit bildet eine kolloidale Masse. Dazu gibt man Methanol bis auf 900 ccm. Es entspricht dem Extrakt (1:15). Durch gründliches Schütteln wird sie abgekühlt<sup>1)</sup> und zentrifugiert. Die obenstehende Flüssigkeit ist gelbbraun und etwas getrübt. Durch Evakuuation bei etwa 80° wird das Methanol abgedampft. 50 ccm eingeeengtes Extraktes (1:5, P<sub>H</sub> 4,5, gelbbraun, getrübt, entsprechend 10 g Material) werden durch Amylacetatextraktion vom gelblichen Farbstoff befreit und vorschriftsmässig bestimmt. Zur Bestimmung des Gesamtaneurins setzt man dem eingeeengten Extrakt „Takadiastase“-Lösung zu.

$$E=0,040. \quad E'=0,200. \quad f=\frac{20}{0,200-0,040}=125.$$

$$x=0,040 \cdot 125 \cdot 100/10=50\gamma \text{ \%}.$$

Ähnliche Methanolbehandlung ist auch bei „Satoimo“ (Colocasia Anticuorum Schott var. esculenta Engl.), Zwiebel von „Oniyuri“ (Lilium lancifolium Thunb.), „Konbu“ (Laminaria japonica Areschoug) und „Wakame“ (Undaria pinnatifida

1) Durch Abkühlung wird die Flockung erleichtert.

Suringar) nötig. Im Falle von „Satoimo“ ist aber die Methanolbehandlung nach Einwirkung der „Takadiastase“ unnötig.

# VI. VERGLEICH DER KOLORIMETRISCH BESTIMMTEN ANEURINWERTE MIT DEN FLUOROMETRISCH BESTIMMTEN.

Wir haben bei denselben tierischen und pflanzlichen Geweben die Aneuringehalte sowohl kolorimetrisch als auch fluorometrisch<sup>2)</sup> bestimmt und die Werte miteinander verglichen. Wie aus den Ergebnissen in Tabelle I ersichtlich, stimmen die beiden Werte in Anbetracht der ungleichmässigen Aneurinverteilung im Gewebe und der möglichen Fehlergrenze der Bestimmung praktisch gut überein. Die Spezifität der Reaktion ist also bei beiden Methoden

TABELLE I.

A: Kolorimetrisch. B: Fluorometrisch.

Versuchsobjekt	Aneuringehalt im Gewebe in $\gamma$ %.			
	frei		insgesamt	
	A	B	A	B
Trockenbierhefe „Ebios“	11650	16750 <sup>1)</sup>	14550	16900 <sup>1)</sup>
Keimnospe von Reis	8500	8450 <sup>1)</sup>	8500	9100 <sup>1)</sup>
Reiskleie	2950	3030 <sup>1)</sup>	2980	3090 <sup>1)</sup>
Sojabohnenmehl „Kinako“	279	265 <sup>1)</sup>	920	973 <sup>1)</sup>
Sojabohnen „Daizu“ <sup>(3)</sup>	722 <sup>2)</sup>	657 <sup>2)</sup>	1050 <sup>2)</sup>	1030 <sup>2)</sup>
Wurzel von „Ninjin“ <sup>(4)</sup>	49,4	43,7 <sup>2)</sup>	66,6 <sup>2)</sup>	56,2 <sup>2)</sup>
Blatt von „Hakusai“ <sup>(5)</sup>	(0) <sup>2)</sup>	(0) <sup>2)</sup>	18,5 <sup>2)</sup>	18,8 <sup>2)</sup>
Meerschweichenmuskel	18,5 <sup>2)</sup>	18,5 <sup>2)</sup>	130,0 <sup>2)</sup>	156,2 <sup>2)</sup>
Muskel mit Haut von „Unagi“ <sup>(6)</sup>	(7,2) <sup>2)</sup>	(6,1) <sup>1)</sup>	(7,7) <sup>2)</sup>	(6,0) <sup>2)</sup>

Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die ungenaueren Werte wegen der zu kleinen bestimmten Zahlen.

<sup>1)</sup> Von S. Kawati bestimmt.

<sup>2)</sup> Von I. Numata bestimmt.

<sup>3)</sup> Glycine Max Merrill.

<sup>4)</sup> *Daucus Carota* L. var. *sativa* DC.

<sup>5)</sup> *Brassica Petsai* Bailey.

<sup>6)</sup> *Anguilla japonica* Temminck et Schlegel.

2) Nach Fujita, Asari und Dohi (1941) bestimmt.

praktisch die gleiche. Bei der kolorimetrischen Bestimmung braucht man aber etwa 100 mal so viel Material. Infolgedessen ist die fluorometrische Methode zur Erforschung der physiologischen und biologischen Probleme zu bevorzugen. Zur Bestimmung des Aneuringehaltes in aneurinreichen Materialien, wie, Hefe, Reiskleie, Reiskeimknospe usw. oder in konzentrierten Aneurinpräparaten ist die kolorimetrische Bestimmung sehr bequem.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde hervorgehoben, dass sich der Aneuringehalt in tierischen und pflanzlichen Geweben manchmal einfacher und bequemer bestimmen lässt als nach der früher von uns beschriebenen Methode und die verbesserte Methodik wurde ausführlich beschrieben und durch Beispiele erläutert. Die kolorimetrisch bestimmten Werte stimmen praktisch mit den fluorometrisch bestimmten gut überein.

#### LITERATUR.

- Fujita, Asari u. Dohi (1941): J. Bioch., **33**, 339, 359.  
 Fujita, Dohi u. Kawati (1942): J. Bioch., **34**, 315.  
 Fujita u. Matsukawa (1941): J. Bioch., **33**, 385.





# ÜBER DIE VERTEILUNG DES VITAMIN B<sub>1</sub> IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN GEWEBEN. I.<sup>1)</sup>

VON

AKIJI FUJITA UND DANJI MATSUKAWA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts  
zu Tokyo.)

(Eingegangen am 16. November 1941)

Im folgenden berichten wir die Ergebnisse der Bestimmungen über die Verteilung des Aneurins in tierischen und pflanzlichen Geweben, die hauptsächlich ernährungsphysiologisch von Bedeutung sind. Die Bestimmung wurde ausschliesslich kolorimetrisch nach unserer Methode (Fujita und Matsukawa 1941, 1942) ausgeführt. Da aber die Notwendigkeit der Inaktivierung der Gewebephosphatase zur Bestimmung des richtigen freien Aneurin-gehaltes, über die wir in der vorigen Arbeit (Fujita, Dohi und Kawati 1942) berichtet haben, erst in dem späteren Stadium unserer Messungen erkannt wurde, blieb sie in vielen Fällen unberücksichtigt.<sup>2)</sup>

## I. ANEURINGEHALTE IN DEN ORGANEN DER TIERE AUSSCHLIESSLICH DER FISCHE.

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle I ersichtlich, wurde das Aneurin unter den Rinderorganen in Herzmuskel, Niere, Leber, Hoden und Nebenniere verhältnismässig reichlich gefunden. Unter den Skelettmuskeln der von uns untersuchten verschiedenen Tiere war das Aneurin in dem des Schweines am reichlichsten vorhanden. Dann folgten Walfisch, Huhn, Rind und Pferd. Da der Aneurin-gehalt nicht nur unter den verschiedenen Arten der Tiere ver-

1) Der Gesellschaft „Nippon Gakuzyutu-Sinkôkai“ danke ich herzlichst für die Unterstützung dieser Arbeit. (A. Fujita).

2) Wurden in den folgenden Tabellen mit \* bezeichnet.

schieden ist, sondern auch je nach der Jahreszeit, dem Ernährungszustand und dem Individuum sehr variieren kann, sollen diese Zahlen nur als ungefähre betrachtet werden. Zur Bestimmung der Aneuringehalte in den Organen der kleineren Tiere ist die fluorometrische Methode praktisch bequemer und die Ergebnisse der Bestimmungen sollen in späteren Arbeiten mitgeteilt werden.

TABELLE I.

Aneuringehalte in den Organen der Tiere.

Datum	Gewebe	Art des Tiers	Aneuringehalt in $\gamma$ %		frei (%)
			frei	insgesamt	insgesamt
14. Oct. 1941	Herzmuskel	Rind	103	416	25
1. Jan. „	„	„	53*	348	15*
3. März „	„	„	112*	400	28*
15. März „	Niere	„	262*	405	65*
4. Oct. „	„	„	161	314	51
14. Oct. „	Leber	„	150	309	49
9. Juli 1940	„	„	128*	228	56*
3. Oct. 1941	„	„	103*	242	42*
4. Oct. „	Hoden	„	79	254	31
19. Nov. „	Nebenniere	„	—	231	—
18. Sept. „	Milz	„	32	151	21
4. Oct. „	Lunge	„	30	98	30
19. Sept. „	Grosshirn	„	—	126	—
20. Sept. „	Kleinhirn	„	—	97	—
20. Sept. „	Dünndarm	„	0	68	0
20. Sept. „	Schleimhaut von Omasus	„	11*	55	21*
14. Oct. „	Rückenmark	„	32	41	77
15. Nov. „	Skelettmuskel	Schwein	200	325	62
1. Oct. „	„	Walbfisch	28	88	32
8. Oct. „	„	Huhn	—	56	—
17. Sept. „	„	Rind	43	47	92
13. Nov. „	„	Pferd	14	37	38

\* Ohne Berücksichtigung der Phosphatase-Inaktivierung bestimmt. Dasselbe gilt auch für die folgenden Tabellen.

## II. ANEURINGEHALT IN FISCHEN.

Die Ergebnisse der Bestimmungen befinden sich in Tabelle II. Man bemerkt als sehr auffallend, dass der dunkelrote Muskel „Tiai“ der Fische im Vergleich zu den sonstigen Muskeln besonders reich an Aneurin ist, wie Hotta (1938) durch Tierversuche zuerst gezeigt hat.<sup>1)</sup> Er hat durch viele Untersuchungen seitens seiner Mitarbeiter bestätigt, dass das „Tiai“ der Fische im Vergleich zu den sonstigen Muskeln bedeutend reich an Cholesterin, Glykogen, Eisen, Glutathion und Indophenoloxydase ist und auf die Bedeutung des „Tiai“ der Fische zum ersten Male aufmerksam gemacht. Fujita, Hata, Numata und Ajisaka (1939) haben im Anschluss an die Ausarbeitung der Bestimmungsmethode des Cytochrom c in Tiergeweben gefunden, dass es betreffs des Gehalts an Cytochrom c auch der Falle ist. Ausserdem fanden wir, dass das Aneurin in „Tiai“ hauptsächlich in veresterter Form vorliegt, während das Aneurin der sonstigen Muskeln hauptsächlich aus der freien Form besteht. Es ist aber zu bemerken, dass die untersuchten Fischmuskeln nicht frisch nach dem Töten untersucht wurden, sondern es müssen einige Tage nach dem Töten verflossen sein, da sie beim Fischhändler gekauft wurden. Ausserdem wurde zur Bestimmung des freien Aneurins die Inaktivierung der Gewebephosphatase nicht berücksichtigt. Es bleibt also die Möglichkeit vorbehalten, dass es sich mit frischen Muskeln etwas anders verhalten kann. Bei „Iwasi“ und „Maika“ war kein freies Aneurin nachweisbar, obwohl das zugesetzte Aneurin vollkommen wiedergefunden wurde. Sehr merkwürdig ist der Befund bei Krebsen, Krabben und Muscheln mit Ausnahme von „Akagai“ und „Kaki“. Ähnlich verhielt es sich auch bei „Warabi“ in Tabelle IV.

Bei „Gazami“ und „Kurumaebi“ konnten wir nur ein Teil des zugesetzten Aneurins nachweisen, während wir bei „Sizimi“, „Asari“ und „Hamaguri“ gar nichts vom zugesetzten Aneurin nachweisen konnten. Dieses Befund wurde auch von Dohi in unserem Laboratorium durch die fluorometrischen Bestimmung bestätigt.

---

1) Nach Hotta ist der Gehalt an Kreatin und Kreatinphosphorsäure in „Tiai“ geringer als in gewöhnlichen Muskeln.

TABELLE II.

Aneuringehalte in Fischen und Muscheln.

Datum	Gewebe	Art des Fisches (Japanische Benennung)	Aneuringehalt in $\gamma$ %		frei (%) insgesamt
			frei	insgesamt	
26. Juni 1941	Dunkelroter Muskel („Tiai“)	Katsuwonus vagans Lesson (Katuo)	318*	1285	25*
” ” ”	Roter Muskel	”	27*	29	94*
23. Juni ”	Dunkelroter Muskel („Tiai“)	Neothunnus macropterus Temm. et Schl. (Kiwadamaguro)	312*	1097	28*
” ” ”	Roter Muskel	”	73*	67	100*
2. Dez. ”	Muskel einschl. Haut	Gyprinus carpio L. (Koi)	72*	480	15*
11. Nov. ”	Muskel (weiss, fast kein „Tiai“)	Limanda angustirostris Kitahara (Karei)	145	418	35
12. Dec. ”	Muskel	Carassius auratus L. (Huna)	71	392	18
15. Nov. ”	” („Tiai“ sehr wenig)	Pagrosomus major Temm. et Schl. (Madai)	90	328	28
13. Dez. ”	Muskel einschl. Haut	Parasilurus asotus L. (Namazu)	44	254	17
21. Nov. ”	Muskel (rot)	Oncorhynchus milktschitsch Walbaum (Masu)	196	193	100
1. Okt. ”	Muskel einschl. „Tiai“	Scomber japonicus Houttuyn (Honsaba)	65	148	44

15. Nov.	"	Muskel	<i>Squalus suckleyi</i> Girard (Aburazame)	32	63	51
21. Nov.	"	"	<i>Theragra chalcogramma</i> Pallas (Suketodara)	19	43	44
13. Nov.	"	" (fast kein „Tiaf“)	<i>Branchiostegus japonicus</i> Houtuyn (Amadai)	12	33	35
20. Nov.	"	Muskel einschl. Haut	<i>Sardinia melanosticta</i> Temm. et Schl. (Iwasi)	0	20	0
8. Nov.	"	Muskel	<i>Sepia esculenta</i> Hoyle (Maika)	0	19	0
13. Nov.	"	"	<i>Portunus trituberculatus</i> Miers (Gazami)	0	0	—
14. Juli	"	Muskel einschl. Eingeweide	<i>Penaeus japonicus</i> Bate (Kurumaebi)	0	0	—
30. Dez.	"	"	<i>Anadara inflata</i> Reeve (Akagai)	15	189	8
15. Nov.	"	"	<i>Ostrea laparousei</i> Thunb. (Kaki)	40	171	23
16. Dez.	"	"	<i>Corbicula leana</i> Prime (Sizimi)	0	0	—
27. Nov.	"	"	<i>Paphia phippinarum</i> Adams et Reeve (Asari)	0	0	—
9. Okt.	"	"	<i>Macretix meretrix</i> L. (Hamaguri)	0	0	—

Es liegt nahe anzunehmen, dass im Extrakt der genannten Gewebe ein Stoff (oder Stoffsystem) vorhanden ist, der das Aneurin zerstört,<sup>1)</sup> aber die Natur desselben ist zur Zeit noch unbekannt und soll erforscht werden.

Einige Beispiele der teilweisen Zerstörung sollen hier angegeben werden.

(1) Weisses Muskel von „Gazami“ (*Portunus trituberculatus* Miers).

50 ccm Extrakt (1:5,  $P_H$  4,4, klar) werden behandelt. Nach direkter Adsorption bestimmt. Xylolschicht trennt sich sehr gut.

(Freies Aneurin)  $E=0$ .  $E'=0,082$ .  $f=20/0,082=244$ .

(Gesamtaneurin)  $E=0$ .  $E'=0,060$ .  $f=20/0,060=334$ .

(2) Muskel einschliesslich Eingeweide von „Kurumaebi“ (*Penaeus japonicus* Bate).

60 ccm Extrakt (1:5, gelblich klar,  $P_H$  4,5, entsprechend 12 g Material, 30 Minuten bei 70° extrahiert) werden behandelt. Durch Benzylalkoholmethode bestimmt.

(Freies Aneurin)  $E=0,002$ .  $E'=0,035$ .  $f=20/0,033=606$ .

(Gesamtaneurin)  $E=0$ .  $E'=0,005$ .  $f=20/0,005=4000$ .

### III. ANEURINGEHALTE IN OBST.

Aus den Ergebnissen in Tabelle III geht hervor, dass das Aneurin unter den untersuchten Obstarten in Orangearten am reichlichsten enthalten ist und das Aneurin im Gegensatz zu Ascorbinsäure in der Öldrüschenschicht der Schale nicht besonders viel enthalten ist (Vgl. Fujita und Ebihara 1939). Aneurin liegt in den meisten Fällen hauptsächlich in freier Form vor.

### IV. ANEURINGEHALTE IN GEMÜSEN.

Die Ergebnisse der Bestimmungen befinden sich in Tabelle IV bis VI. Unter den Blättern und Stengeln fand ich das Aneurin

---

1) Dass das Aneurin dabei nicht oxydiert wird, ist daraus zu schliessen, dass das zugesetzt Aneurin selbst nach Einwirkung des Schwefelwasserstoffs über Nacht nicht nachgewiesen werden konnte.



TABELLE III.  
Aneuringegehalte in Obst.

Datum	Gewebe	Art (Japanische Benennung)	Aneuringegehalt in $\gamma$ %		frei (%) insgesamt
			frei	insgesamt	
6. März 1941	Fruchtfleisch	Citrus deliciosa Tenore (Mikan)	100*	104	96*
8. März "	"	"	75*	83	90*
19. März "	"	Citrus Aurantium L. („Nevel orange“)	86*	86	100*
3. Mai "	Fruchtfleisch ausschl. Endocarp	Citrus Natsudaidai Hataya (Natumikan)	76*	81	94*
" "	Exocarp (Öldrüschicht)	"	72*	—	—
25. Mai "	Fruchtfleisch	Citrus nobilis var. poonensis Hataya (Ponkan) aus Kagosima	86*	80	100*
1. Mai "	"	Fragaria grandiflora Ehrh. (Orandaigo „Hukubaitigo“)	27*	36	75*
1. Juli "	Unreifes Fruchtfleisch einschl. Schale	Pruus Mumie Sieb. et Zucc. (Ume)	19*	24	79*
12. Juni "	Fruchtfleisch einschl. Schale	Pruus Cerasus L. (Ôto)	23*	24	96*
14. Juni "	Fruchtfleisch	Musa sapientum L. (Banana)	28*	23	100*
1. Juli "	Fruchtfleisch einschl. Schale	Pruus Armeniaca L. var. Ansu Maxim. (Anzu)	15*	22	68*
15. März "	"	Malus pumila Mill. var. dulcissima Koidz. (Ringo „Kokko“)	15*	15	100*
8. Nov. "	Fruchtfleisch	Diospyros Kaki Thunb. (Kaki „Zenzimaru“)	9	(5)	100
28. Mai "	"	Eriobotrya japonica Lindl. (Biwa)	0*	0	—

TABELLE IV.  
Aneuringehalte in Gemüsen (1).  
Blätter und Stengel.

Datum	Gewebe	Art (Japanische Benennung)	Aneuringehalt in $\gamma$ %		frei (%) insgesamt
			frei	insgesamt	
8. Mai 1941	Junger Sprössling (grün, obere Hälfte)	<i>Asparagus officinalis</i> L. var. <i>altilis</i> L. ( <i>Asparagus</i> )	172*	190	91*
5. Juni "	Junger Sprössling (weiss, obere Hälfte)	"	116*	170	68*
22. März "	Blatt	<i>Spinacia oleracea</i> L. ( <i>Hörensô</i> )	—	129	—
22. Dec. "	Blatt (trocken)	<i>Undaria pinnatifida</i> Suringar ( <i>Wakame</i> )	—	128	—
8. Mai "	Blume	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L. ( <i>Hanayasai</i> )	142*	125	100*
16. Mai "	Blatt	<i>Apium petersillium</i> (Paseri)	107*	123	87*
4. Juli "	"	<i>Brassica campestris</i> L. var. <i>Komatsuna</i> Matsum. et Nakai ( <i>Konatsuna</i> )	45*	101	44*
27. Sept. "	"	<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>acanthiformis</i> Makino ( <i>Daikon</i> )	36*	95	38*
29. Mai "	Junge Kelchblätter	<i>Cynara scolymus</i> L. ( <i>Tyôsenazami</i> )	65*	83	78*
30. April "	Obere Hälfte des jungen Sprösslings ausschl. Blätter („Takenoko“)	<i>Phyllostachys edulis</i> A. et C. Riv. ( <i>Môsôitiku</i> )	69*	79	87*

23. Mai	"	Blatt	<i>Allium odorum</i> L. (Nira)	64*	69	93*
16. Mai	"	Blatt	<i>Brassica oleracea</i> L. (Saradana)	52*	58	90*
3. Juni	"	Ankeimende Bohnen („Moyasi“)	—	48*	54	89*
20. Mai	"	Blatt (Zentralteil)	<i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata L. (Kyabetu)	48*	49	98*
23. Mai	"	Blatt (Grüner Teil)	<i>Allium fistulosum</i> L. (Negi)	45*	48	94*
24. Mai	"	Blatt (Weisser Teil)	"	24*	30	80*
27. Mai	"	Blatt	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L. var. spatiosum Bailey (Syungiku)	44*	45	98*
31. März.	"	Blatt	<i>Brassica japonica</i> Thunb. (Kyôna)	18*	35	51*
27. März.	"	Blatt	<i>Brassica Petsai</i> Bailey (Hakusai)	26*	28	93*
10. Mai	"	Blattstiel	<i>Petasites japonicus</i> Miq. (Huki)	7*	13	50*
30. Mai	"	Sprossling	<i>Pteridium aquilinum</i> Kuhn (Warabi)	0*	0	—

TABELLE V.

## Aneuriegehalte in Gemüsen (2).

## Früchte.

Datum	Gewebe	Art. (Japanische Benennung)	Aneuriegehalt in $\gamma$ %		frei (%) insgesamt
			frei	insgesamt	
4. Juni 1941	Bohne	Glycine Max Merrill. (Daizu)	722*	1050	69*
5. Juni "	"	Phaseolus angularis Wight (Azuki)	354*	505	70*
10. Juni "	"	Phaseolus vulgaris L. (Ingenmame)	457*	457	100*
10. Mai "	"	Pisum sativum L. („green peas“)	368*	390	94*
5. Mai "	"	Vicia Faba L. (Soramame)	167*	233	72*
15. Juli "	Ganze Frucht	Lycopersicon esculentum Mill. (Tomato)	82*	117	70*
7. Mai "	Hülse (unreif) einschl. Bohnen.	Pisum sativum L. (Sayaeudô)	96*	95	100*
10. Juni "	" (reif)	Phaseolus vulgaris L. (Sayaingen)	49*	53	92*
10. Juli 1940	Schale	Cucurbita moschata Duch. var. melonaeformis Makino (Kabotya)	22*	—	—
22. Mai 1941	Ganze Frucht	Cucumis sativus L. (Kiuri)	18*	22	82*

TABELLE VI.  
 Aneuringehalte in Gemüsen (3).  
 Wurzeln und Knollen.

Datum	Gewebe	Art (Japanische Benennung)	Aneuringehalt in $\gamma$ %		frei (%)
			frei	insgesamt	insgesamt
18. Sept. 1941	Wurzel	<i>Daucus Carota</i> L. var. <i>sativa</i> DC. (Ninjin)	109	116	94
3. Juli	„	<i>Ipomoea Batatas</i> Lam. var. <i>edulis</i> Makino (Satumaimo)	95*	106	90*
3. Juli	„	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Zyagaimo)	83*	102	81*
14. Juni	„	<i>Sagittaria trifolia</i> L. var. <i>sinensis</i> Makino (Kuwai)	79*	102	77*
8. Nov.	„	<i>Colocasia Antiquorum</i> Schott var. <i>esculenta</i> Engl. (Satoimo)	78	79	100
27. Mai	„	<i>Allium sativum</i> L. forma <i>pekinense</i> Makino (Ninniku)	60*	68	88*
5. Juni	„	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gongylodes</i> L. (Kaburatamana)	57*	65	88*
28. Nov.	„	<i>Lilium lancifolium</i> Thunb. (Oniyuri)	45	57	79
11. Nov.	„	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (Hasu)	38	57	67
23. Juni	„	<i>Allium Bakeri</i> Regel (Rakkyô)	46*	51	90*
5. Dez.	„	<i>Dioscorea Batatas</i> Deene (Nagaimo)	50	48	100
20. Mai	„	<i>Allium Cepa</i> L. (Tamanegi)	26*	39	67*
13. Mai	„	<i>Brassica Rapa</i> I. (Kabu)	25*	35	71*
16. Mai	„	„ (rot)	22*	23	96*
16. Mai	„	<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Syôga)	17*	20	85*
12. Juni	„	<i>Arcetium Lappa</i> L. (Gobô)	15*	18	84*
22. Mai	„	<i>Zingiber Mioga</i> Rosc. (Myôga)	9,9*	13	76*

sehr reich in Spargel, Spinat, Blumenkohl, Rapsblatt, Rettichblatt und Artischocke. Versterktes Aneurin ist in den Blättern verhältnismässig mehr zu finden als in den Stengeln und Blumen. Unter den Früchten ist das Aneurin in Bohnen entschieden viel enthalten. Unter den Wurzeln und Knollen erwiesen sich die folgenden als aneurinreich: Mohrrübe, Batate, Kartoffel, „Kuwai“, „Satoimo“ usw. Bas Aneurin besteht hauptsächlich aus der freien Form. Zur Bestimmung des freien Aneurins wurde bei „Satoimo“ die Inaktivierung der Phosphatase berücksichtigt, aber wir fanden, dass es hauptsächlich in freier Form vorliegt.

#### V. ANEURINGEHALT IN GETREIDEN UND MEHLEN.

Aus den Ergebnissen in Tabelle VII ersieht man, dass die Keimknospen von Reis eine sehr reichliche Aneurinquelle darstellen. Etwa ein Drittel davon ist in Reiskleie und etwa ein Fünftel davon im Endosperm enthalten und zwar hauptsächlich in freier Form. In Sojabohnenmehl findet man nur etwa ein Zehntel des Aneurins wie in den Reiskeimknospen.

TABELLE VII.

Aneuringehalte in Getreiden und Mehlen.

Datum	Material	Aneuringehalt in $\gamma\%$		frei(%)
		frei	insgesamt	insgesamt
22. Apr. 1941	Keimknospe von Reis	8480*	9100	93*
24. Apr. „	Reiskleie	3030*	3090	98*
8. Juli „	Reis (70% poliert) aus Etigo	139*	167	83*
23. April „	Sojabohnenmehl „Kinako“	279*	920	30*

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ergebnisse der Aneurinbestimmungen in verschiedenen tierischen und pflanzlichen Geweben wurden tabellarisch angegeben.

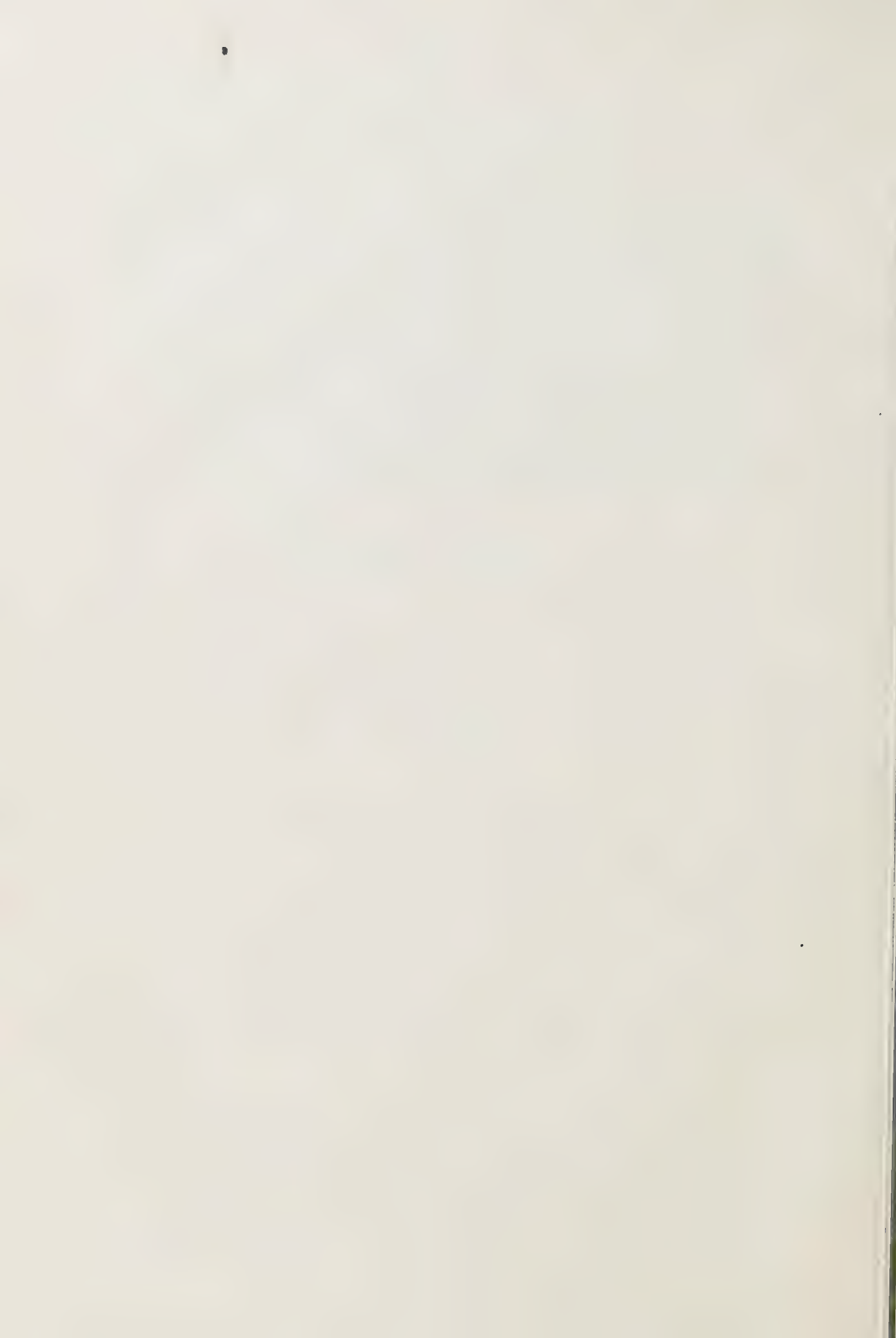
Es wurde hervorgehoben, dass ein aneurinzerstörender Stoff (oder Stoffsystem) in den Extrakten von vielen Muscheln und Krebsen vorkommt.



Die Bestimmung der Aneurinverteilung soll fluorometrisch noch feiner in einzelnen Geweben und noch weiter in den verschiedenen Arten fortgesetzt werden.

## LITERATUR.

- Fujita u. Ebihara (1939): Bioch. Z., **300**, 143.  
Fujita, Dohi u. Kawati (1942): J. Bioch. (im Druck).  
Fujita, Hata, Numata u. Ajisaka (1939): Bioch. Z., **301**, 376.  
Fujita u. Matsukawa (1941): J. Bioch., **33**, 385.  
Fujita u. Matsukawa (1942): J. Bioch., **35**, 79.  
Hotta (1938): Nippon-Gakuzyutukyôkai-Hôkoku, **13**, 439.  
Hotta (1941): Nippon-Seikagakukai-Kaihô, **16**, 115.



## STUDIES ON CARBOXYPEPTIDASE.

By

TAKEFUMI UTSUNOMIYA.

(From the Biochemical Institute, Nagasaki Medical College.

Director: Prof. Dr. T. Uchino.)

(Received for publication, November 19, 1941)

### INTRODUCTION.

In one of a long series of papers, dealing with the specificity of proteolytic enzymes, Waldschmidt-Leitz and Balls (1931) reported on the action of carboxypeptidase on three isomeric chloracetyl derivatives of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids and pointed out that only the meta compound is hydrolyzed with readiness, while the other two are quite resistant to it. Their experiments were, however, performed at pH 7.6 alone. Inasmuch as the optimum pH of an enzyme action may by no means be the same for different substrates, it is desirable to reexamine the experiments under the different pH of the medium. Furthermore it will be of interest to advance the experiment and to compare the enzymatic cleavability of other homologous halogen substituted acid derivatives of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids, such as  $\alpha$ -bromopropionyl as well as  $\alpha$ -bromo-isocaprolyl compounds.

### MATERIALS AND METHODS.

Substrates: 1. Chloracetyl tyrosine was prepared according to the method of E. Fischer (1904). It melted at 154°C. and gave, N, 5.34% (calculated for  $C_{11}H_{12}NO_4Cl$ , N, 5.44%).

2. Chloracetyl-*p*-aminobenzoic acid was prepared by the method of Tropp (1928). The substance melted at 256°C. and gave, N, 6.36% (calculated for  $C_9H_8NO_3Cl$ , N, 6.55%).

3. Chloracetyl-*o*- and -*m*-aminobenzoic acids were prepared according to the method described by Waldschmidt-Leitz and Balls (1931). The ortho compound melted at 183°C. and the meta

compound at 231.5°C. The former gave, N, 6.46% (calculated for  $C_9H_8NO_3Cl$ , N, 6.55%) and the latter, N, 6.40% (calculated for  $C_9H_8NO_3Cl$ , N, 6.55%).

4.  $\alpha$ -bromo-propionyl-*p*-aminobenzoic acid was prepared from  $\alpha$ -bromopropionyl bromide and *p*-aminobenzoic acid as described by Grassmann, Klenk and Peter-Mayr (1935). It melted at 232°C. and gave, N, 5.11% (calculated for  $C_{10}H_{10}NO_3Br$ , N, 5.15%).

5.  $\alpha$ -bromo-propionyl-*o*- and -*m*-aminobenzoic acids were prepared in exactly the same manner as in the case of para compound. The *o*-derivative melted at 168°C. and gave, N, 4.89% (calculated for  $C_{10}H_{10}NO_3Br$ , N, 5.15%). The meta compound melted at 246°C. and gave, N, 5.00% (calculated for  $C_{10}H_{10}NO_3Br$ , N, 5.15%).

6.  $\alpha$ -bromo-isocapronyl-*m*- and -*p*-aminobenzoic acids were prepared by the interaction of  $\alpha$ -bromo-isocapronyl bromide with *m*- or *p*-aminobenzoic acid as follows: 14 grams of *m*- or *p*-aminobenzoic acid were dissolved in 100 cc. of 1*N* NaOH solution in a flask fitted with a reflux condenser and, shaking continuously, 30 grams of  $\alpha$ -bromo-isocapronyl bromide were added in a small portion at a time. Alternately with this, 1*N* NaOH was added to the solution in a small portion in order to always maintain the mixture alkaline. When all the bromide was added the solution was acidified with 5*N* hydrochloric acid. Bromoisocapronyl-aminobenzoic acid separated out as an amorphous product. It was filtered off, dissolved in a small quantity of hot alcohol and precipitated in a crystalline form with the addition of an equal bulk of hot water, followed by cooling. The substance was recrystallized from a 50 per cent aqueous alcohol. The meta compound melted at 206°C. and the para body at 180°C. The former gave, N, 4.22% (calculated for  $C_{13}H_{16}NO_3Br$ , N, 4.46) and the latter, N, 4.19% (calculated for  $C_{13}H_{16}NO_3Br$ , N, 4.46%).

7.  $\alpha$ -bromo-isocapronyl-*o*-aminobenzoic acid was prepared from  $\alpha$ -bromo-isocapronyl bromide and *o*-aminobenzoic acid in almost the same manner as in the case of para and meta compounds. On acidifying the reaction mixture with 5*N* hydrochloric acid, a

pasty mass separated out. This was dissolved in ether and evaporated to a syrupy consistency. Petroleum ether was then added to it and the mixture was allowed to stand in a cold place for several days.  $\alpha$ -bromo-isocaprolyl-*o*-aminobenzoic acid crystallized out in the form of a fine needle. It melted at 115°C and gave, N, 4.27% (calculated for  $C_{13}H_{16}NO_3Br$ , N, 4.46%).

Enzymes: Carboxypeptidase and enterokinase were prepared by the method of Waldschmidt-Leitz and his co-workers, described in "Bertho-Grassmann's Biochemisches Praktikum." Just before each experiment carboxypeptidase was activated with the addition of an equal volume of enterokinase solution and by allowing it to stand in a thermostat at 30°C. for 30 minutes.

Experimental procedure: A sample of 0.5 milli mol substrate was weighed in a 25.0 cc. measuring flask and dissolved in 1.5–3.5 cc. 1*N* NaOH solution with the addition of a small amount of distilled water. 2.5 cc. 1*M*  $KH_2PO_4$  solution and 10.0 cc. of the activated carboxypeptidase solution were then added to the mixture and the volume was made up to 25.0 cc. with water. By changing the amount of 1*N* NaOH, just employed from 1.5 to 3.5 cc. for bringing the substrate in solution, the required pH of the solution is attained. From this solution a 5.0 cc. sample was immediately pipetted out and titrated. About 3 cc. were then used for pH determination and the flask was placed in a thermostat at 30°C. Toluene was used as an antiseptic. The titration was carried out with *N*/20 NaOH solution by the formol titration method. In the case of strongly alkaline solution, 5.0 cc. of *N*/20 HCl solution was added to the sample and then titrated with NaOH solution to the end point. After 8, 24 and 48 hours (in the case of chloracetyl tyrosine, after 15, 30 and 60 minutes) further samples were withdrawn and titrated. Under our experimental conditions an increase in the acidity of 2.0 cc. *N*/20 NaOH corresponds to 100 per cent hydrolysis. As some of the substrates employed were unstable in alkaline medium and liable to undergo spontaneous hydrolysis, control experiments were carried out with a special precaution. One of them was performed using only a buffer and an enzyme, and the other using only a substrate and a buffer.

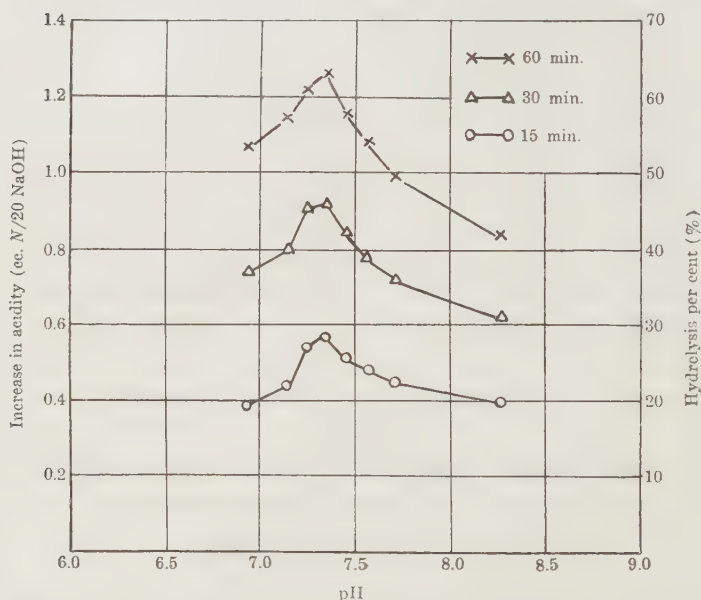
## EXPERIMENTAL RESULTS.

*I. Action of carboxypeptidase on chloracetyl tyrosine.*

At first we tested the activity of our enzyme preparation by using chloracetyl tyrosine as a substrate. The results are recorded in Fig. 1.

Fig. 1.

Action of carboxypeptidase on chloracetyl tyrosine at varying pH.  
Increase in acidity after 15, 30 and 60 minutes. Temp. = 30°C.



From Fig. 1 it is clear that the enzyme is able to hydrolyze chloracetyl tyrosine to the extent of 64 per cent within 60 minutes at pH 7.35. The optimum pH accords well with that reported by Waldschmidt-Leitz and Purr(1929), as well as by Itibakase (1940).

*II. Action of carboxypeptidase on chloracetyl-o-, -m- and -p-aminobenzoic acids.*

The action of carboxypeptidase on chloracetyl-o-, -m- and -p-



Fig. 2.

Action of carboxypeptidase on chloracetyl-*m*-aminobenzoic acid at varying pH.  
Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.

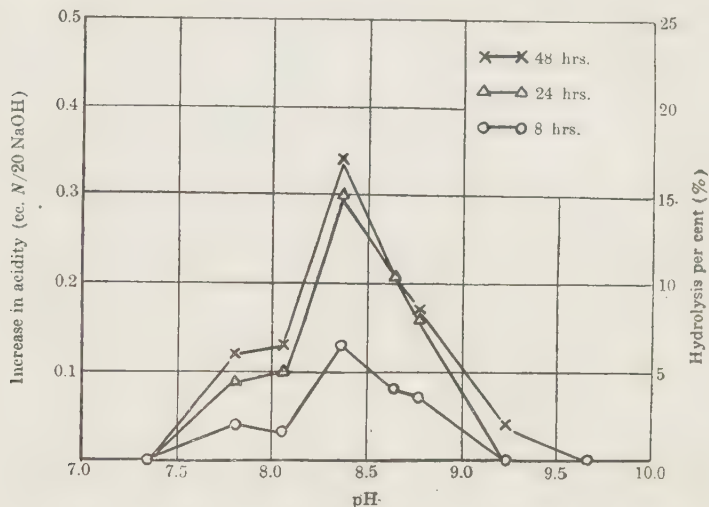
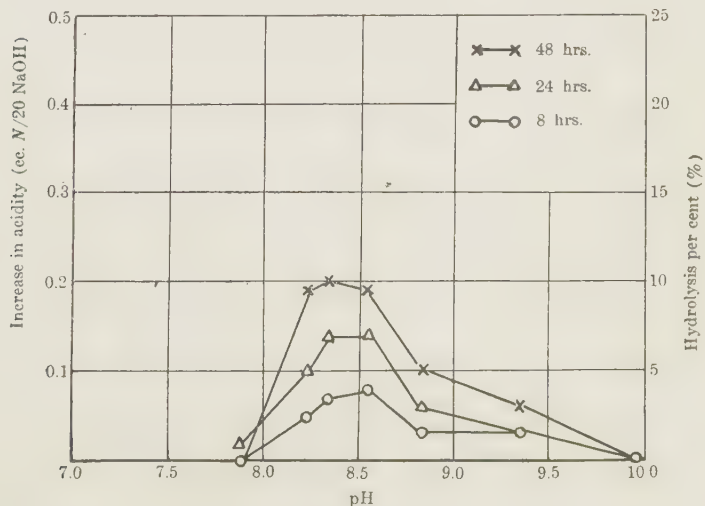


Fig. 3.

Action of carboxypeptidase on chloracetyl-*p*-aminobenzoic acid at varying pH.  
Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.



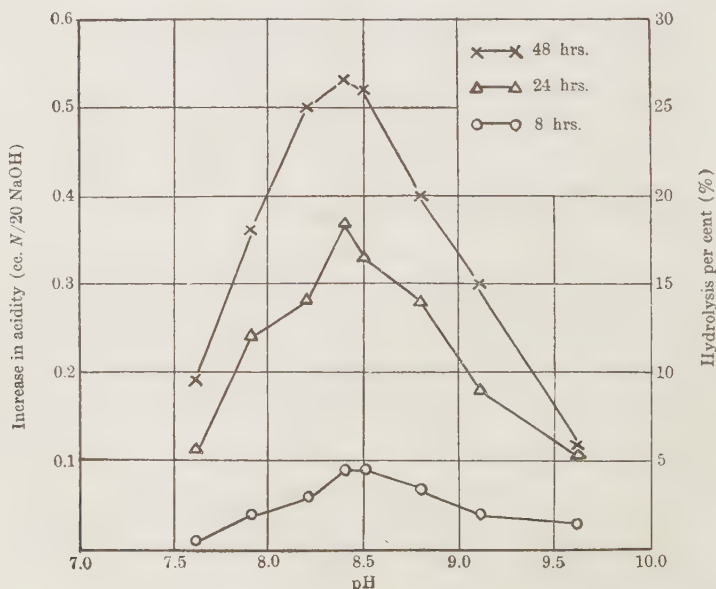
aminobenzoic acids was the examined at different pH values of the medium and the results obtained are represented in Figs. 2 and 3.

It is evident from Figs. 2 and 3, that chloracetyl-*m*-aminobenzoic acid is readily split by carboxypeptidase; para compound also undergoes hydrolysis, though at a slower rate than the meta compound. The optimum pH lies at 8.4–8.5 in both cases. Waldschmidt-Leitz and Balls (1931) stated that chloracetyl-*p*-aminobenzoic acid is not reacted by carboxypeptidase at pH 7.6. This finding is undoubtedly due to the fact that pH 7.6 lies outside the range of optimum pH. Our experiment (Fig. 3) also shows that the enzyme is completely inactive at this pH value. Chloracetyl-*o*-aminobenzoic acid is not acted upon by carboxypeptidase.

Fig. 4.

Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-propionyl-*m*-aminobenzoic acid at varying pH.

Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.



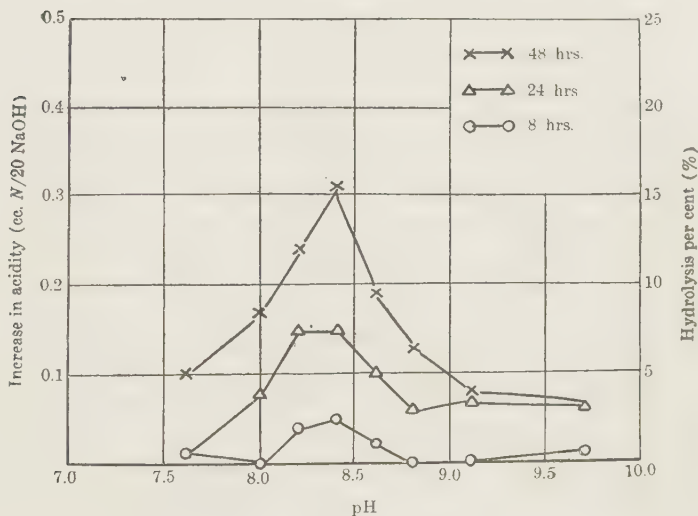
III. Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-propionyl-*o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids.

In this section the action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-propionyl-*o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids was studied and the results are shown in Figs. 4 and 5.

Fig. 5.

Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-propionyl-*p*-aminobenzoic acid at varying pH.

Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.



Just as in the case of chloracetyl derivatives, only *p*- and *m*-compounds are hydrolyzed, *m*-compound being more readily attacked than *p*-compound, while ortho body was found to be quite resistant to the enzyme action. The optimum pH for the action on *p*- and *m*-compounds lies at 8.4.

IV. Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-isocaprolyl-*o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids.

We then examined the action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-isocaprolyl-*o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids at different pH values.

Fig. 6.

Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-isocapro-*m*-aminobenzoic acid  
at varying pH.

Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.

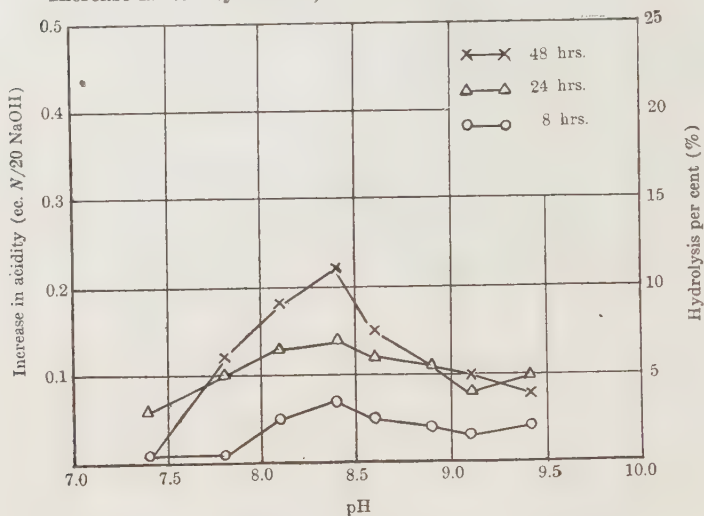
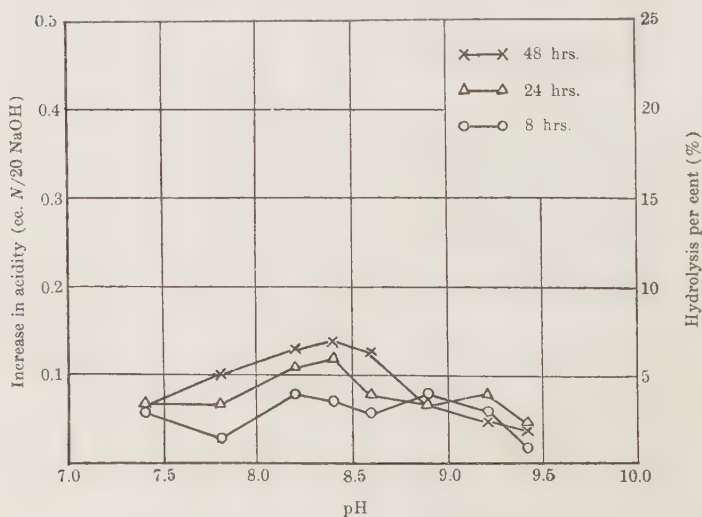


Fig. 7.

Action of carboxypeptidase on  $\alpha$ -bromo-isocapro-*p*-aminobenzoic acid  
at varying pH.

Increase in acidity after 8, 24 and 48 hours. Temp. = 30°C.



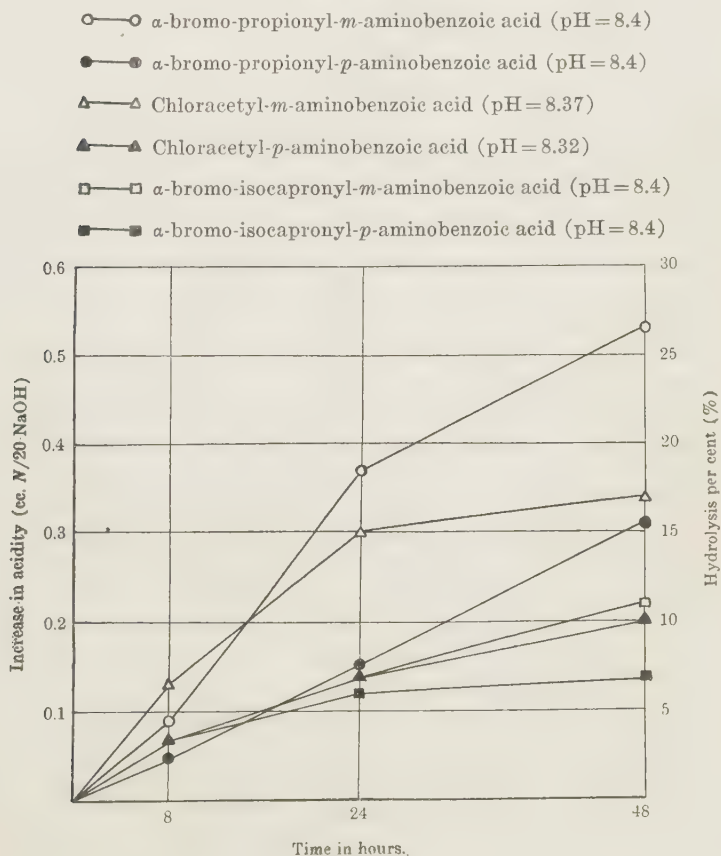
Figs. 6 and 7 indicate that *m*- and *p*-compounds are split by carboxypeptidase, the latter with less speed than the former. Both the optimum pH lies at 8.4. *o*-Compound was found to undergo no hydrolysis by the enzyme.

In Fig. 8, the rates of hydrolysis of chloracetyl,  $\alpha$ -bromo-propionyl and  $\alpha$ -bromo-isocaproonyl derivatives of *m*- and *p*-amino-benzoic acids by means of carboxypeptidase were compared.

Fig. 8.

Hydrolysis rates of chloracetyl-,  $\alpha$ -bromo-propionyl- and  $\alpha$ -bromo-isocaproonyl-*m*- and *p*-aminobenzoic acids by carboxypeptidase.

Temp. = 30°C.



From Fig. 8 it will be seen that  $\alpha$ -bromo-propionyl derivatives are hydrolyzed by carboxypeptidase more quickly than chloracetyl derivatives and the latter more quickly than  $\alpha$ -bromo-isocapronyl derivatives; in all cases meta compounds are split with greater readiness than para compounds.

V. *Effect of the addition of o-, m- and p-aminobenzoic acids on the carboxypeptidase activity.*

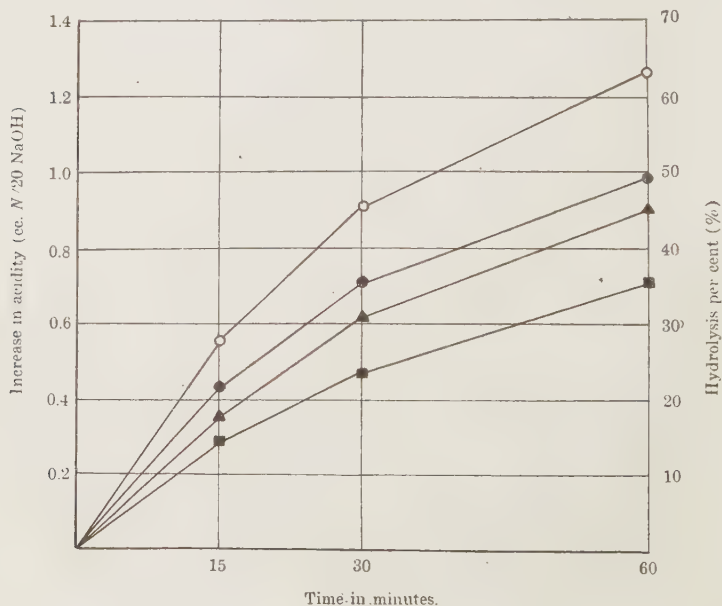
In the preceding experiment, it was observed that the halogen substituted acid derivatives of *m*- and *p*-aminobenzoic acids undergo

Fig. 9.

Effect of *o*-aminobenzoic acid on carboxypeptidase activity.

Temp. = 30°C.

- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine (pH = 7.35)
- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine + 0.25 m. mol *o*-aminobenzoic acid (pH = 7.31)
- ▲—▲ 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine + 0.5 m. mol *o*-aminobenzoic acid (pH = 7.29)
- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine + 1.0 m. mol *o*-aminobenzoic acid (pH = 7.35)





hydrolysis by carboxypeptidase, while the corresponding compounds of *o*-aminobenzoic acid are not attacked by the enzyme. In this connection a question arises that this different behaviour of *o*-, *m*- and *p*-acids derivatives towards carboxypeptidase may be due to the difference in the inhibitory effect exerted by each of these aminobenzoic acids, which were set free in the course of the enzyme action. In order to determine this question the effect caused by the addition of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids on carboxypeptidase was examined, using chloracetyl tyrosine as a substrate. The results are given in Figs. 9-11.

Fig. 10.

Effect of *m*-aminobenzoic acid on carboxypeptidase activity.

Temp. 30°C.

- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine (pH=7.35)
- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine+0.25 m. mol *m*-aminobenzoic acid (pH=7.34)
- ▲—▲ 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine+0.5 m. mol *m*-aminobenzoic acid (pH=7.25)
- 0.5 m. mol chloracetyl tyrosine+1.0 m. mol *m*-aminobenzoic acid (pH=7.36)

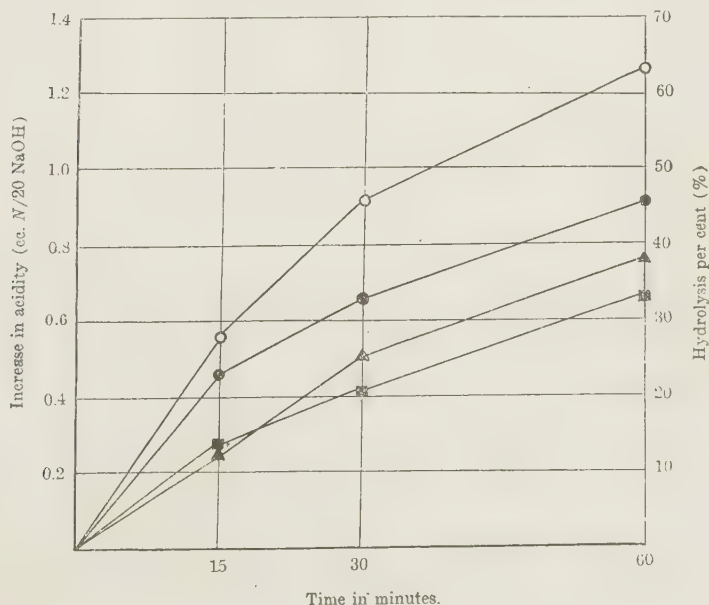
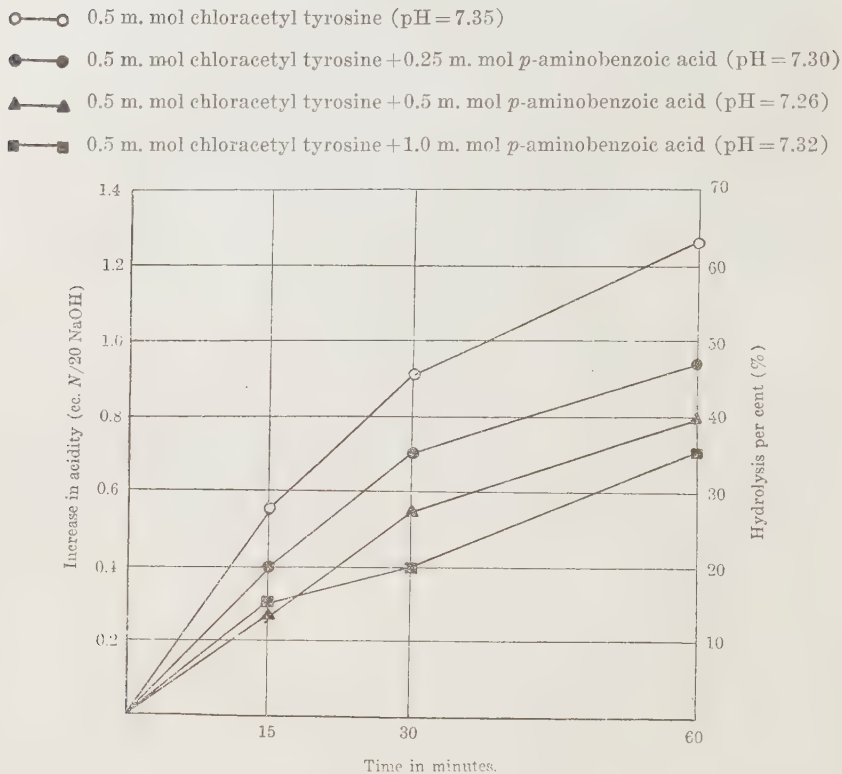


Fig. 11.

Effect of *p*-aminobenzoic acid on carboxypeptidase activity.  
Temp. = 30°C.



Figs. 9-11 show us that *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids at concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mol per molecule of a substrate cause a marked decrease in hydrolysis of chloracetyl tyrosine by carboxypeptidase. There exists, however, no notable difference in the inhibitory effect of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids.

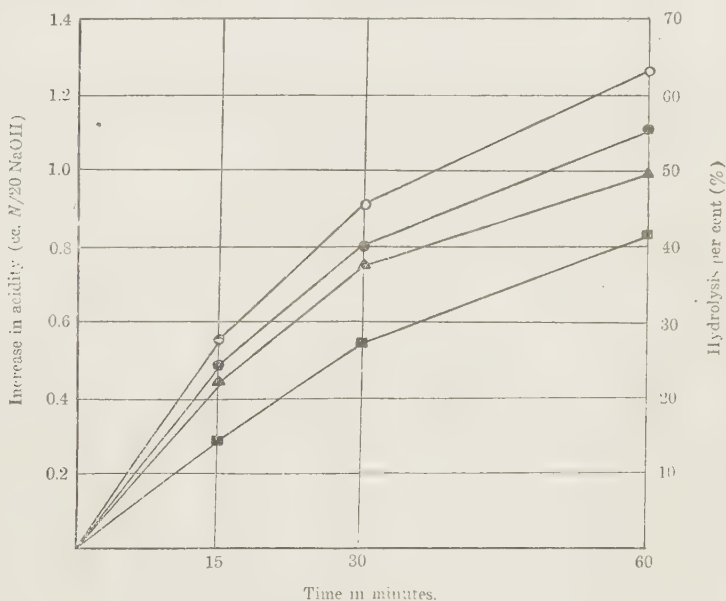
#### VI. Effect of the addition of monochloroacetic acid on the carboxypeptidase activity.

The effect of monochloroacetic acid on the action of the

carboxypeptidase was then studied and the results as shown in Fig. 12 were obtained.

Fig. 12.  
Effect of monochloroacetic acid on carboxypeptidase activity.  
Temp. = 30°C.

- 0.5 m. mol chloroacetyl tyrosine (pH=7.35)
- 0.5 m. mol chloroacetyl tyrosine + 0.25 m. mol monochloroacetic acid (pH=7.34)
- ▲—▲ 0.5 m. mol chloroacetyl tyrosine + 0.5 m. mol monochloroacetic acid (pH=7.27)
- 0.5 m. mol chloroacetyl tyrosine + 1.0 m. mol monochloroacetic acid (pH=7.32)



It was found that monochloroacetic acid also exercises an inhibitory effect on carboxypeptidase.

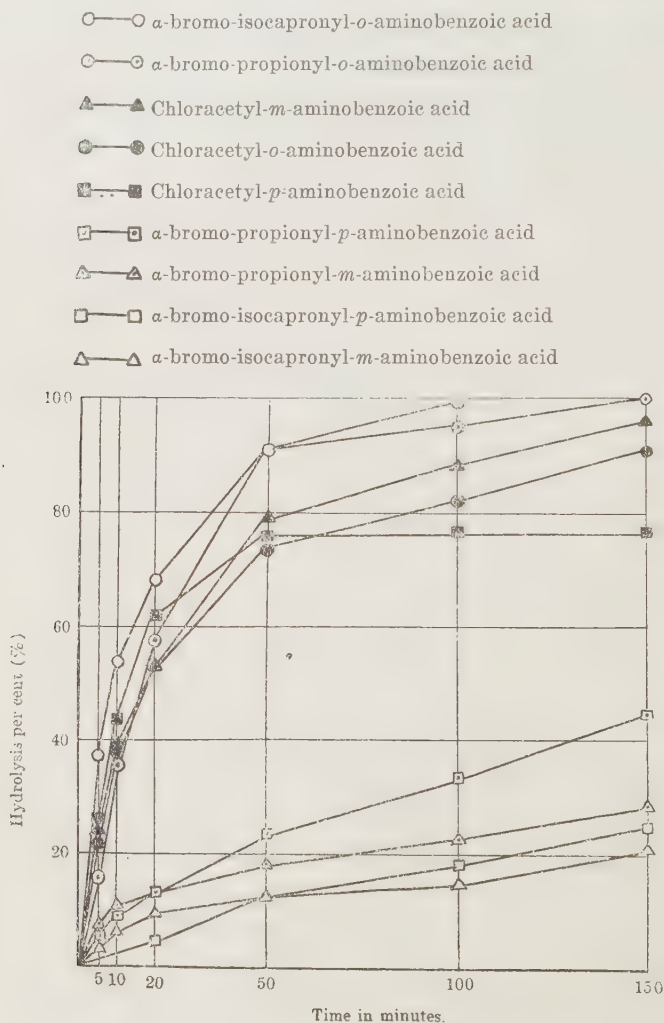
VII. *Comparison of the rates of alkali hydrolysis of chloroacetyl,  $\alpha$ -bromo-propionyl and  $\alpha$ -bromo-isocaprolyl compounds of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids.*

Experiments were carried out as follows. A sample of 0.5 milli mol substances was weighed in a 25.0 cc. volumetric flask and

dissolved in 12.5 cc. of 1.0*N* NaOH solution and the volume was made up to 25.0 cc. with water. The concentration of NaOH in the solution was thus 0.5*N*. The solution was mixed as rapidly

Fig. 13.

Alkali hydrolysis of halogen acyl aminobenzoic acids in 0.5*N* NaOH at 30°C.



as possible and kept in a thermostat at 30°C. From time to time 3.0 cc. of the mixture was pipetted out, neutralized with the addition of 3.0 cc. 0.5*N* HCl solution and titrated with *N*/20 NaOH by the formol titration method, using phenolphthalein as an indicator. Under the present experimental conditions an increase in the acidity of 1.2 cc. *N*/20 NaOH corresponds to 100 per cent hydrolysis. The results are represented in Fig. 13.

The results in Fig. 13 show that chloracetyl-*o*-, -*m*- and -*p*-aminobenzoic acids all undergo hydrolysis with a great readiness. The hydrolysis rates of  $\alpha$ -bromo-propionyl- and  $\alpha$ -bromo-isocapronyl-*o*-aminobenzoic acids are nearly the same as those of chloracetyl compounds, while the corresponding derivatives of *m*- and *p*-acids are split at much a lower rate. These findings show us that there exist no particular relations between the behaviour of these substances to alkali hydrolysis and their cleavability with enzyme.

#### SUMMARY.

In the present experiments the action of carboxypeptidase on chloracetyl,  $\alpha$ -bromo-propionyl and  $\alpha$ -bromo-isocapronyl derivatives of *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids was examined at a different pH value of the medium.

1. Of all the substrates tested only *m*- and *p*-aminobenzoic acids derivatives are hydrolyzed by carboxypeptidase. *m*-compounds being always more readily attacked than *p*-compounds. *o*-aminobenzoic acid compounds are, however, found to be quite resistant to the enzyme.

2. The optimum pH for the action on *m*- and *p*-compounds lies at 8.4.

3.  $\alpha$ -bromo-propionyl derivatives are most rapidly split by carboxypeptidase. Chloracetyl compounds are hydrolyzed at a lower rate than  $\alpha$ -bromo-propionyl compounds, but more quickly than  $\alpha$ -bromo-isocapronyl derivatives.

4. *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acids exert a similar inhibitory effect on carboxypeptidase. Monochloroacetic acid also inhibits the activity of carboxypeptidase.

5. There exist no relations between the rate of alkali hydrolysis of these aminobenzoic acid compounds and their cleavability by means of carboxypeptidase.

In conclusion the author wishes to express his sincere thanks to Prof. Dr. T. Uchino for his kind direction throughout this work.

The expence of this research was defrayed from the Scientific Expenditure of the Department of Education. T. Uchino.

#### REFERENCES.

- Fischer, E. (1904): Ber., **37**, 2486.  
Grassmann, Klenk und Peter-Mayr (1935): Biochem. Z., **280**, 307.  
Itibakase (1940): J. Biochem., **32**, 355.  
Tropp (1928): Ber., **61**, 1431.  
Waldschmidt-Leitz und Balls (1931): Ber., **64**, 45.  
Waldschmidt-Leitz und Purr (1929): Ber., **62**, 2217.



## ÜBER DIE BESTIMMUNG DES PROVITAMIN A. II.<sup>1)</sup>

### Bestimmung des Kryptoxanthins.

VON

MASANOBU AJISAKA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts  
zu Tokyo. Direktor: Dr. A. Fujita.)

(Eingegangen am 20. November 1941)

Kryptoxanthin ist bisher in einigen pflanzlichen Geweben nachgewiesen und quantitativ bestimmt worden. (Über die Literatur vgl. Ajisaka 1942). Eine allgemeingültige Bestimmungsmethode des Kryptoxanthins ist bisher noch nicht ausgearbeitet worden. Bei der bekannten Fraktionierungsmethode der einzelnen Carotinoide von Kuhn und Brockmann (1932) wird Kryptoxanthin als Carotin mitbestimmt, da Kryptoxanthin wie Carotin bei der Verteilung zwischen Benzin und 90 proz. Methanol die Oberschicht aufsucht und die Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln fast identisch mit  $\beta$ -Carotin ist. Auch das Adsorptionsverhalten gegenüber einer Säule von Calciumkarbonat aus Benzin ist bei beiden Carotinoiden recht ähnlich. Die beiden werden daran kaum adsorbiert. Bei der Bestimmung des „Caricaxanthins“ in Fruchtfleisch von „Ponkan“ sowie Papaya haben Yamamoto und Tin (1933) angenommen, dass die am Aluminachromatogramm durch Petrolbenzin nicht eluierbaren epiphasischen Farbstoffe ausschliesslich aus Kryptoxanthin bestehen, was aber im allgemeinen nicht der Fall ist.<sup>2)</sup>

---

1) Der Gesellschaft „Nippon Gakuzyutu-Sinkôkai“ danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit, die vorläufig am 22. Oktober 1941 auf dem Biochemischen Kongress zu Kumamoto mitgeteilt wurde. (A. Fujita).

2) Die epiphasischen Farbstoffe aus Fruchtfleisch von „Ponkan“ zeigten sich nach Verfassers Versuch am  $Al_2O_3$ -Chromatogramm, ausser Carotin und Kryptoxanthin noch zwei helle, gelbe Zonen, während die aus Fruchtfleisch von Papaya noch vier Zonen (1. orange, 2. hellrosa, 3. grün, 4. hell rosa) nachweisen liessen.

Nach Verfassers Versuch ergab sich für die Fraktionierung der einzelnen Carotinoide das Chromatogramm am Aluminiumoxyd und Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) als am zweckmässigsten. Dabei ergab sich, dass *Kryptoxanthin nach stundenlangem Aufgiessen von Entwicklungsmittel immer etwa 1 cm unterhalb der Oberfläche der Adsorptionssäule als eine scharfe Zone hängen bleibt*. Zur quantitativen Bestimmung ist diese Zone abzupipettieren und nach Elution wird das Kryptoxanthin in Petroläther gelöst und photometriert. Die zur Berechnung nötige Faktor wurde nach Reindarstellung der Kryptoxanthinkrystalle experimentell bestimmt. Für die quantitative Bestimmung des Kryptoxanthins ist darauf zu achten, dass der Extrakt im Gegensatz zu Carotin erst verseift werden muss, da Kryptoxanthin, welches selbst ein Alkohol ist, in Pflanzengewebe als veresterte Form vorliegen kann. Als charakteristische Abweichung von Carotin wandert Kryptoxanthin, wie seit den Untersuchungen von Kuhn und Grundmann (1934) bekannt ist, bei der Verteilung zwischen Benzin und 95 proz. Methanol deutlich nach unten, während die beiden Farbstoffe zwischen Benzin und 90 proz. Methanol gleichfalls epiphasisch sind. Aber die Verteilung zwischen 95 proz. Methanol ist nach Verfassers Versuch nicht vollständig, so dass dieses Verhalten zur quantitativen Trennung des Kryptoxanthins von Carotin nicht verwendet werden kann.

Im folgenden beschreibe ich die Vorschrift der quantitativen Bestimmung des Kryptoxanthins, die sich nach zahlreichen Bestimmungen am besten bewährt hat. Da in der folgenden Beschreibung die Apparate, Reagenzien und Ausführungen im wesentlichen die gleichen sind, wie bei der Bestimmung des Carotins (Vgl. Fujita, Narita und Ajisaka 1940), so sollen nur die besonderen ausführlich beschrieben werden.

#### APPARATE UND GEFÄSSE.

1. Einige Mörser.
2. Glas- bzw. Quarzsand.
3. Einige Glasfilter und Saugflaschen.
4. Einige Scheidetrichter von je 100 ccm Inhalt bzw. 200 ccm.

5. Ein Kippseher Apparat und einige Waschflaschen.
6. Ein Quecksilber-Manometer.
7. Einige Adsorptionsrohre und eine Kühlvorrichtung.
8. Ein Glasstab und eine Glasnadel.
9. Ein Petroläthergefäß mit Pfropfen, bestehend aus einer Pipette und einer Gummikappe.
10. Einige Reagensgläser mit Marken von 1 bis 20 ccm.
11. Eine Wasserstrahlpumpe mit Vorrichtung gegen Rückfluss.

#### ERFORDERLICHE REAGENZIEN.

1. Methanol.
2. Petroläther (Siedepunkt: 40 bis 75°C).
3. 5 proz. Kaliumhydroxyd in Äthylalkohol.
4. 90 Vol-proz. Methanollösung.
5. Benzol-Petroläther (1:1).

Gleiche Volumina von Benzol und Petroläther werden gemischt.

6. Aluminiumoxyd (reinst, wasserfrei von Merek).

Das japanische Handelspräparat von Takeda erwies sich als nicht zweckmässig. Es muss erst aktiviert werden. Über die Aktivierung vgl. Ruggli und Jensen 1935 sowie Kondô 1937.

7. Methanol-Petroläther.

Petroläther wird mit Methanol gesättigt.

#### AUSFÜHRUNG.

##### 1. Extraktion.

$a\text{ g}^{1)}$  des zu untersuchenden Materials werden mit Glässand fein verrieben. Nach Zusatz von Methanol wird der Brei gut gerührt und durch einen Glasfilter abgesaugt. Der Rückstand wird erst mehrmals mit Methanol dann wiederholt mit Petroläther extrahiert, bis das Filtrat farblos abläuft. Die sämtlichen Auszüge werden in einem grösseren Scheidetrichter vereinigt.<sup>2)</sup> Wasser von

1) 2 bis 20 g werden verwendet. Je nach dem Gehalt an Kryptoxanthin wird die zu bestimmende Menge variiert.

2) Bei der Bestimmung des Carotins haben wir beschrieben, dass der Petroläther- bzw. Methanolextrakt zuerst bis auf 20 bis 30 ccm einengt wird; da aber die Einengung des Methanol-Extraktes etwas umständlich ist, ist die Trennung der beiden Schichten ohne Einengung praktisch zu bevorzugen.

etwa 1/9 Volumen des Methanolextraktes wird zugesetzt und das Gemisch wird stark geschüttelt. Die Methanolphase wird mit einer kleinen Menge Petroläther geschüttelt und die Extraktion mehrmals wiederholt. Die Petrolätherphasen werden vereinigt und im Vakuum auf etwa 20 bis 30 ccm eingeeengt. Die Lösung wird mit einem gleichen Volumen 5 proz. äthylalkoholischem Kali bei etwa 20° ungefähr 20 Stunden hydrolysiert, mit 1,5fachem Volumen Wasser verdünnt und zur Trennung in den Scheidetrichter getan. Die Seifenlösung wird mit einer kleinen Menge Petroläther geschüttelt. Die Extraktion wird mehrmals wiederholt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden nach mässigem Einengen, mit einem gleichen Volumen 90 proz. Methanol geschüttelt und die Extraktion wird mehrmals wiederholt. Die Petrolätherphase wird mit einem gleichen Volumen Wasser gewaschen und das Waschen wird noch 2 bis 4mal wiederholt. Der Extrakt wird im Vakuum auf etwa 1 ccm eingeeengt.

## 2. *Chromatographie.*

Man beschickt das auf der Saugflasche vertical montierte Rohr nach Zugabe eines Wattebauses mit einer geeigneten Menge Petroläther und Aluminiumoxyd und saugt mässig. Nach weiterem Zusatz von Petroläther und Aluminiumoxyd unter Saugen achtet man darauf, dass die Säule stets, ohne Unterbrechung mit Flüssigkeit bedeckt bleibt. Man stellt so eine etwa 14 bis 15 cm lange Aluminiumoxydsäule her.

Von oben wird das Rohr mit eingeeengtem Extrakt beschickt und nach dem Eindringen desselben in die Säule wird der Petroläther, mit dem Reagensglas und Pipette gespült wurden, nachgegossen. Man setzt das Aufsaugen von Petroläther fort, wobei die Farbringe auseinandergezogen werden. Carotine laufen aber durch Petroläther allein nicht durch.<sup>1)</sup> Nunmehr entwickelt man

---

1) Beim Chromatogramm mit  $\text{Ca(OH)}_2$  und bei einigen japanischen Aluminapräparaten liefen Carotine mit Petroläther allein allmählich durch, was aber mit dem Aluminiumoxyd (reinst, wasserfrei, Merck) nicht der Fall war. Erst durch Aufgiessen von Benzol-Petroläther traten Carotine aus der Säule aus.

das Chromatogramm durch Benzol-Petroläther (1:1),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin steigen gemeinsam allmählich ab und treten schliesslich aus der Säule aus. Verschiedene Farbenzonen werden dabei entwickelt, und die Kryptoxanthinzone bleibt als eine schmale scharf begrenzte orangerote Zone etwa 1 cm unterhalb der Säulenoberfläche hängen. Nach genügender Entwicklung (1 bis 2 Stunden) wird die Entwicklung unterbrochen. Nach Beschießen mit Petroläther und vorsichtiger Beseitigung der oberen Zonen wird die Kryptoxanthinzone quantitativ abpipettiert und in den Glasfilter gebracht. Durch Waschen und wiederholtes Nachwaschen mit Petroläther, der mit Methanol gesättigt worden ist, wird die eluierte Kryptoxanthinlösung in ein Reagensglas gesammelt. Nach Verdünnen mit Petroläther bis zu einer geeigneten Konzentration wird die Lösung im Pulfrich-Photometer bestimmt.

### 3. Berechnung.

Das Volumen der Kryptoxanthinlösung sei  $m$  ccm. Diese Lösung werde bei der Bestimmung auf das  $v$  fache verdünnt. Die gemessene Extinktion (S47, 5,00 mm) sei  $E$ , und die genommene Materialmeng sei  $a$  g. Dann wird der Gehalt an Kryptoxanthin  $x$  mg pro 100 g Ausgangsmaterial nach folgender Formel berechnet.

$$x = 0,95 \cdot \frac{Emv}{a}$$

### BEMERKUNGEN.

1. Wenn mehrere Zonen etwa 1 cm unterhalb der Säulenoberfläche auftreten, so muss der Farbstoff der einzelnen Zone mit einer geeigneten Menge Kryptoxanthin<sup>1)</sup> gemischt und wie in der Vorschrift chromatographiert werden. Wenn wirklich Kryptoxanthin vorliegt, so treten durch Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) keine getrennten Zonen auf.

---

1) Über die Darstellung des Kryptoxanthins vgl. Ajisaka (1942). Zur Mischchromatographie braucht man nicht immer die Lösung aus reinen Krystallen herzustellen. Dazu kann man die Lösung, die aus einheitlicher Kryptoxanthinzone des Chromatogramms hergestellt worden ist, ebensogut verwenden.



2. Rubixanthin, das Isomere des Kryptoxanthins, welches von Kuhn und Grundmann (1934, 1, 3) in den Früchten von *Rosa canina*, *R. rubiginosa*, *R. damascena* sowie der wildwachsenden Reinrose entdeckt wurde, soll sich bei der Entmischungsprobe und bei dem Adsorptionsversuch dem Kryptoxanthin ganz ähnlich verhalten und chromatographisch schwer davon trennen lassen. Das Spektrum dieses Farbstoffes ist verschieden von dem des Kryptoxanthins aber dem des  $\gamma$ -Carotins ähnlich, nämlich :

	Optische Schwerpunkte (m $\mu$ )					
	In Schwefelkohlenstoff			In Benzin (70–80°)		
Kryptoxanthin	519	483	452	485,5	452	424
Rubixanthin	533	494	461	495,5	463	432
$\gamma$ -Carotin	533,5	496	463	495	462	431
Lycopin	548	507,5	477	506	475,5	447

Wenn einer der genannten Farbstoffe allein vorkommt, so ist es spektroskopisch nicht schwer, sie voneinander zu unterscheiden. Wenn aber Kryptoxanthin nebst Rubixanthin vorliegt, so verhalten sich die beiden Farbstoffe am Chromatogramm ähnlich, aber die Trennung der beiden Farbstoffe ist nach Verfassers Versuch möglich, indem man das Chromatogramm mit Benzol-Petroläther (1:1) tüchtig nachentwickelt. (Vgl. Experim. Teil).

3. Kryptoxanthin ist von Lycopin mittels  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , wie von Kuhn und Grundmann (1933) hervorgehoben wurde, nicht scharf trennbar. In Gegenwart von Lycopin ist es zweckmässig, dass man nach chromatographischer Adsorption an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  die Farbstoffe der Kryptoxanthinfraktion erneut an  $\text{CaCO}_3$  adsorbieren lässt. Dabei befindet sich das Kryptoxanthin oben und das Lycopin unten. Die beiden Zonen treten nach fortschreitender Entwicklung durch Benzol-Petroläther aus der Säule heraus. Die Farbe am  $\text{CaCO}_3$ -Chromatogramm sieht gelblicher aus als bei  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

4.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin können durch  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Chromatogramm nicht getrennt bestimmt werden, wie wir (Fujita, Narita und Ajisaka 1940) schon hervorgehoben haben. Dazu muss die aus der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule durch fortschreitende Entwicklung mittels Benzol-



Petroläther ausgetretene Fraktion auf  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  erneut chromatographiert werden.  $\gamma$ -Carotin, das Verfasser bisher nur beim Versuch mit Früchten der Wildrose in einer bedeutenden Menge gefunden hat,<sup>1)</sup> tritt im Gegensatz zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin aus der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule durch Benzol-Petroläther nicht aus. Es befindet sich als eine rotbraune Zone oberhalb des  $\beta$ -Carotins und unterhalb des Lycopins. Die Grenze mit Lycopin ist nicht scharf. Durch erneutes Chromatogramm lässt es sich von Lycopin trennen. (Vgl. Versuchsbeispiele 9).

#### VERSUCHSBEISPIELE.

##### *I. Die Gewebe, deren epiphasische Farbstoffe hauptsächlich aus Kryptoxanthin bestehen.*

(1) *Zea mays* L. („Tômorokosi“, orangerote Art).

30 g Maiskorn werden gemahlen und vorschriftsmässig behandelt.

$E = 0,79$ ,  $m = 10,0$ ,  $v = 1$ ,  $a = 30$ .  $x = 0,95 \cdot 0,79 \cdot 10/30 = 0,25 \text{ mg\%}$ .

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 1.

(2) *Citrus Unshiu* Marcov. („Unsyûmikan“ aus Kagosima).

10 g Schalen werden behandelt.  $E = 0,335$ ,  $m = 5,0$ ,  $v = 26$ ,  $a = 10$ .  $x = 0,95 \cdot 0,335 \cdot 5 \cdot 26/10 = 4,14 \text{ mg\%}$ .

Befund am Chromatogramm (nach 60 Minuten Entwicklung) vgl. Abb. 2.

Die 3. orange Zone erwies sich nach Mischchromatogramm als nicht identisch mit Kryptoxanthin.

##### *II. Die Gewebe, deren epiphasische Farbstoffe hauptsächlich aus Carotinen bestehen.*

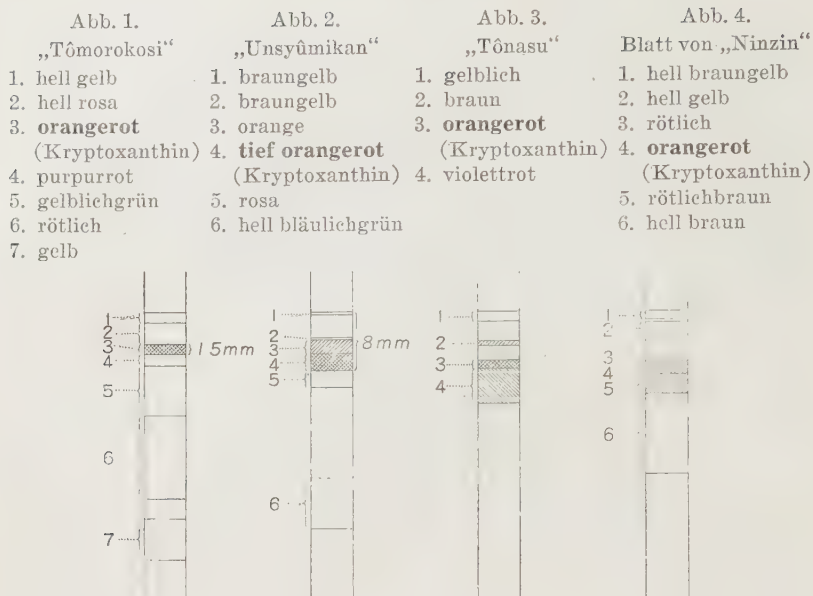
(3) *Cucurbita moschata* var. *melonaeformis* Makino („Tônasu“).

10 g Fruchtfleisch werden behandelt.  $E = 0,115$ ,  $m = 2,0$ ,  $v = 1$ ,  $a = 10$ .  $x = 0,95 \cdot 0,115 \cdot 2/10 = 0,022 \text{ mg\%}$ .

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 3.

---

1) Eine kleine Menge  $\gamma$ -Carotin findet man auch bei Mohrrüben.



(4) Blatt von *Daucus Carota* L. var. *sativa* DC. („Ninzin“).

5 g Blätter werden behandelt.  $E=0,23$ ,  $m=4,0$ ,  $v=1$ ,  $a=5$ .  
 $x=0,95 \cdot 0,23 \cdot 4/5=0,18 \text{ mg\%}$ .

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 4.

(5) Grüner Tee („Gyokuro“, Nr. 5).

2 g grüner Tee (getrocknet) werden behandelt.  $E=0,245$ ,  
 $m=4,0$ ,  $v=1$ ,  $a=2$ .  $x=0,09 \cdot 0,245 \cdot 4/2=0,47 \text{ mg\%}$

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 5.

(6) *Capsicum annuum* L. („Tôgarasi“).

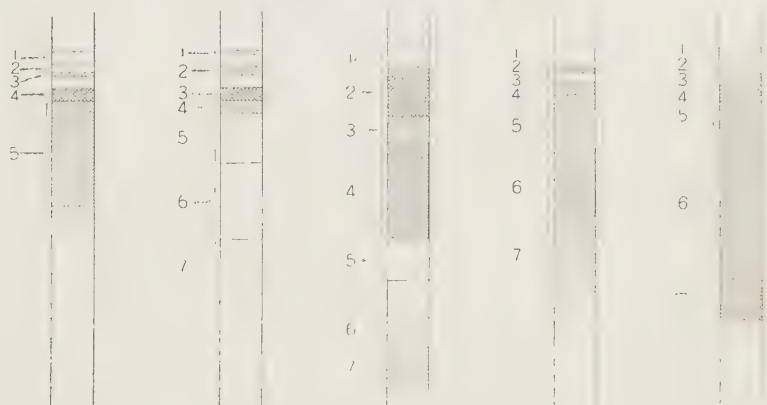
7 g Fruchtfleisch (braunrot, getrocknet) werden behandelt.  
 Der Extrakt betrug 14 ccm. 1 ccm davon wird auf 5,0 ccm auf-  
 gefüllt und die Lösung wird zum Photometrieren noch aufs 9fache  
 verdünnt.

$E=0,27$ ,  $m=5,0$ ,  $v=9$ ,  $a=7$ .

$$x = \frac{0,95 \cdot 0,27 \cdot 5 \cdot 9}{7} \cdot \frac{14}{1} = 23,1 \text{ mg\%}.$$

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 6.

Abb. 5.	Abb. 6.	Abb. 7.	Abb. 8.	Abb. 9.
Grüner Tee („Gyokuro“)	Schoten von „Tôgarasi“	„Tomato“	Schale von „Kaki“	„Noibara“
1. hell bräun- lichtgelb	1. orange	1. hell braun	1. hell bräun- lichgelb	1. braungelb
2. hell gelb	2. purpurrot	2. <b>tief braun</b>	2. orangerot	2. gelbbraun
3. braun	3. <b>tief orange- rot</b> (Krypto- xanthin)	3. braunrot (Lycopin)	3. hell orangerot	3. rotbbraun (Rubixanthin)
4. <b>orangerot</b> (Kryptoxan- thin)	4. purpurrot	5. rosarot	4. <b>tief orange- rot</b> (Krypto- xanthin)	4. <b>tief rotbraun</b> (Lycopin)
5. rötlichbraun	5. hell bräun- lichrot	6. gelb	5. rosarot	5. braunrot
	6. hell grün- lichgelb	7. <b>orangerot</b> (Carotin)	6. <b>tief rot</b> (Lycopin)	6. <b>tief rot</b> (Lycopin)
	7. hell braunrot		7. rosarot	7. <b>rotorange</b> ( $\gamma$ -Carotin)



### III. Die Gewebe, deren epiphasische Farbstoffe hauptsächlich aus Lycopin bestehen.

(7) *Lycopersicon esculentum* Mill („Tomato“).

20 g Fruchtfleisch werden behandelt. Am Chromatogramm wird eine bedeutende Menge Carotin und Lycopin aber kein Kryptoxanthin nachweisbar.

Befund am Chromatogramm vgl. Abb. 7.

(8) Schale von *Diospyros Kaki* Thunb. („Fuyu-Gaki“).

10 g Schale werden behandelt. Auf dem Chromatogramm befinden sich 3 orangerote Zonen, von denen sich nur die unterste durch Spektroskopie und Mischchromatographie als richtiges Kryptoxanthin erwies. (Vgl. Abb. 8).

$$E=0,34, m=10,0, v=21, a=10.$$

$$x=0,95 \cdot 0,34 \cdot 10 \cdot 21/10=6,78 \text{ mg\%}.$$

*IV. Die Gewebe, deren epiphasische Farbstoffe  
Rubixanthin enthalten.*

(9) *Rosa multiflora* Thunb. („Noibara“).

10 g Fruchtfleisch werden behandelt. Am Chromatogramm findet man in der 3., 4. und 5. Zone je einen rotorange Farbring. Durch Spektroskopie und Mischchromatographie erkennt man, dass Kryptoxanthin in keiner Zone enthalten ist. Der Farbstoff in der 4. rotbraunen Zone entspricht Rubixanthin und der in der 7. rotorange Zone entspricht  $\gamma$ -Carotin. Es ist das erste pflanzliche Gewebe, in dem Verfasser nach zahlreichen Untersuchungen an pflanzlichen Geweben eine bedeutenden Menge  $\gamma$ -Carotin nachweisen konnte.  $\gamma$ -Carotin tritt im Gegensatz zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin durch Nachentwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) nicht aus der Säule aus, sondern bleibt unterhalb des Lycopins hängen.

EXPERIMENTELLES.

*1. Extinktionskurve des Kryptoxanthins.*

0,5 mg%ige Kryptoxanthinlösung<sup>1)</sup> wird mit verschiedenen Lichtfilter photometriert. Die gefundene Extinktionskurve ist in Abb. 10 gezeigt. Für die praktische Bestimmung erwies sich Filter S47 bequemer als S45.

*2. Konzentration und Extinktion.*

Die Extinktion ist der Konzentration genau proportional (Abb. 11). Daraus ergibt sich der  $f$ -Wert d. h.  $\text{mg\%/}E$  (S47, 5,00 mm) 0,95.

*3. Entmischungsverhalten des Kryptoxanthins.*

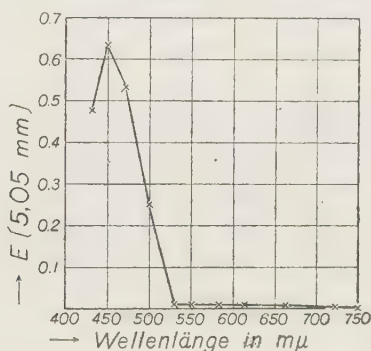
Kuhn und Grundmann (1933) haben zuerst hervorgehoben,

---

1) Dargestellt aus „Tôgarasi“ (Vgl. Ajisaka 1942). Schmelzpunkt 161°C. Durch wiederholtes Abdampfen mit Benzol wurde es frei von Krystall-Methanol gemacht.

dass Kryptoxanthin bei der Verteilung zwischen Benzin und 90 proz. Methanol wie  $\beta$ -Carotin die Oberschicht aufsucht, während es bei Verwendung von 95 proz. Methanol im Gegensatz zu  $\beta$ -

Abb. 10.



Carotin deutlich nach unten wandert. Es ist nach der Beschreibung der Autoren nicht klar, ob es dabei vollständig oder teilweise in Methanolschicht übergeht. Ich habe daher untersucht, wie sich die Verteilung mit der Zunahme der Methanolkonzentration verhält.

Abb. 11.

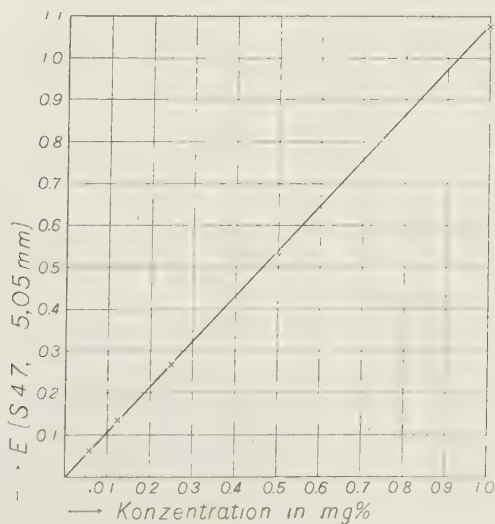


TABELLE I.

Gleiche Volumina Methalkohol und Kryptoxanthinlösung werden geschüttelt.

Entmischung mit	% Kryptoxanthin geht in Methanolphase
90 proz. Methanol	0
95 „ „	25
97 „ „	47

Aus den Ergebnissen in Tabelle I ist zu ersehen, dass die Verteilung bei 95 proz. Methanol nicht vollständig ist. Selbst bei Verwendung von 97 proz. Methanol geht nur die Hälfte in die Methanolphase. Wegen dieser Eigenschaft kann es also zur quantitativen Trennung von  $\beta$ -Carotin- und Kryptoxanthin nicht angewandt werden.

#### 4. Verhalten am Chromatogramm.

Es wurde mit epiphasischer Farbstofflösung aus Fruchtfleisch von „Ponkan“ (*Citrus poonensis*) das chromatographische Verfahren mittels folgender Adsorptionsmittel versucht.

(1)  $\text{CaCO}_3$ . Aus der Lösung in Petroläther wird Kryptoxanthin durch die  $\text{CaCO}_3$ -Säule nicht scharf adsorbiert. Es tritt nach Aufgiessen des Petroläthers aus der Säule heraus.

(2)  $\text{Ca(OH)}_2$  (Takeda). Durch Entwicklung mit Petroläther allein oder noch besser mit Benzol-Petroläther (1:1) wird die Kryptoxanthinzone entwickelt, aber die Zone ist ziemlich weit und die Grenze nicht scharf. Auch nach Entwicklung mit 1 proz. Äthylalkohol in Petroläther wird die Zone nicht scharf.

(3) 1 T. Fasertonerde + 4 T.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Merck). Durch Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) wird die Kryptoxanthinzone weit und nicht scharf.

(4) Aluminiumoxyd (Takeda, zur Chromatographie). Durch Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) wird die Kryptoxanthinschicht etwas weit und die Grenze ist nicht sehr scharf. Dies kann jedoch zur Bestimmung des Kryptoxanthins auch brauchbar sein.

(5) Aluminiumoxyd (Merck, wasserfrei). Durch Entwick-



lung mit Benzol-Petroläther (1:1) erwies sich die Kryptoxanthinzone am schärfsten. Zur Entwicklung ist 1 proz. Äthylalkohol bzw. 1–2 proz. Methanol in Petroläther ungeeignet. Zur Elution hat sich Methanol-Petroläther am besten bewährt.

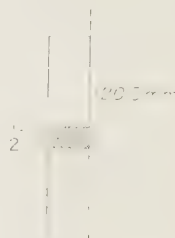
### 5. Mischchromatogramm mit Rubixanthin.

Rubixanthin wurde aus Fruchtfleisch von „Noibara“ (*Rosa multiflora*) chromatographisch isoliert<sup>1)</sup> und mit Kryptoxanthin am Aluminiumoxyd mischchromatographiert. Nach Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) in etwa 120 Minuten zeigten sich die beiden Farbstoffe als getrennte Zonen, wobei Kryptoxanthin unten auftrat. (Vgl. Abb. 12).

### 6. Mischchromatogramm mit Lycopin.

Lycopin wurde aus reifem Fruchtfleisch von „Karasuuri“ (*Trichosanthes cucumeroides* Maxim.) chromatographisch isoliert<sup>1)</sup> und mit Kryptoxanthin auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mischchromatographiert. In Gegenwart von viel Lycopin nebst wenig Kryptoxanthin<sup>2)</sup> oder in Gegenwart von einer etwa gleichen Menge beider Farbstoffe<sup>3)</sup> erwies sich die Trennung der beiden Farbstoffe nach 1,5 bis 2 Stunden langer Entwicklung mit Benzol-Petroläther (1:1) als möglich, obwohl die Grenze nicht sehr scharf war.<sup>4)</sup> Dabei war die

Abb. 12.  
Mischchromatogramm  
von Kryptoxanthin  
und Rubixanthin  
(Nach 120 Minuten)  
1. rotbraun  
(Rubixanthin)  
2. rotorange  
(Kryptoxanthin)



1) Bei der Darstellung wurde genau ebenso verfahren wie bei der Bestimmung des Kryptoxanthins, einschliesslich Verseifung und  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Chromatogramm, wobei sich das Lycopin als eine tief rote Zone oberhalb von  $\beta$ -Carotin befand. (vgl. auch Abb. 7). Rubixanthin trat als eine rotbraune Zone etwa an der Stelle des Kryptoxanthins auf. (Abb. 9).

2) Der Versuch wurde mit einem Gemisch von je 2,0 ccm etwa 8,6 mg%igem Lycopin und 0,4 mg%igem Kryptoxanthin gemacht.

3) Ein Gemisch von je 2,0 ccm etwa 0,4 mg%iger beider Farbstofflösungen wurde zum Versuch verwendet.

4) Die Farbe der Kryptoxanthinzone am  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Chromatogramm: braunrot. Die des Lycopins: rosarot.

Reihenfolge der Zonen umgekehrt. Im ersteren Falle befand sich die Kryptoxanthinzone oben, während sie sich im letzteren Falle unten zeigte. Die Trennung des Kryptoxanthins auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  aus einem Gemisch von wenig Lycopin nebst viel Kryptoxanthin erwies sich als unmöglich. Als sehr zweckmässig<sup>5)</sup> erwies sich die Abtrennung der beiden Farbstoffe durch  $\text{CaCO}_3$ -Chromatographie, wenn von beiden Farbstoffen etwa je eine gleiche Menge vorliegt.<sup>3)</sup> Die beiden Farbstoffe trennen sich als isolierte Zonen, wobei sich das Kryptoxanthin oben befindet. In Gegenwart von viel Lycopin nebst wenig Kryptoxanthin<sup>6)</sup> konnten aber die beiden Farbstoffe nicht scharf getrennt werden.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde eine allgemeingültige Bestimmungsmethode des Kryptoxanthins in pflanzlichen Geweben ausgearbeitet, ausführlich beschrieben und mit einigen Beispielen erläutert.

Herrn Dr. A. Fujita spreche ich meinen besten Dank für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit aus.

#### LITERATUR.

- Ajisaka (1942): J. Biochem., **34**, 421.  
Fujita, Narita und Ajisaka (1940): Tokyo Izisinsi, **3185**, 9. Vgl. auch Biochem. Z. (1941): noch nicht angekommen.  
Kondo (1937): Yakugaku-Zasshi, **57**, 832.  
Kuhn und Brockmann (1932): Z. Physiol. Chem., **206**, 41.  
Kuhn und Grundmann (1933): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **66**, 1746.  
Kuhn und Grundmann (1934, 1): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **67**, 339.  
Kuhn und Grundmann (1934, 2): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **67**, 593.  
Kuhn und Grundmann (1934, 3): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **67**, 1133.  
Ruggli und Jensen (1935): Helv. Chim. Acta, **18**, 624.  
Yamamoto und Tin (1933): Nippon Nôgeikagakukai, **9**, 642.

---

5) Die Farbe der Kryptoxanthinzone am  $\text{CaCO}_3$ -Chromatogramm: gelb. Die des Lycopins: braungelb.

6) Ein Gemisch von je 2,0 ccm etwa 8,6 mg%iger Lycopin- und 0,4 mg%iger Kryptoxanthinlösung wurde zum Versuche verwendet.

## ÜBER DEN STOFFWECHSEL DER TIERE BEI DER CHAULMOOGRAÖLINJEKTION.

### Über den Einfluss des Chaulmoograöls auf die Phosphorverbindungen im Blute.

VON

JOKICHI KOYANAGI.

(Aus dem Biochem. Institut der Kumamoto Med. Fakultät.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 24. November 1941)

Der Zweck dieser Versuche liegt in der Erforschung der Veränderungen, welche die Phosphorverbindungen im Blut durch intravenöse Injektion des Chaulmoograöls erfahren.

In einer früheren Mitteilung (1940 b) wurde vom Verfasser darauf hin gewiesen, dass die Injektion des freien Fettsäure enthaltenden Chaulmoograöls im Gegensatz zu der des neutralen Chaulmoograöls eine schädliche Wirkung hat, und dass sie, wahrscheinlich fettige Degeneration auslösend, zur Vermehrung des neutralen Fettes in allen Organen führt. Demnach soll man bei klinischer Anwendung des Chaulmoograöls das neutrale Öl benutzen. Auf Grund dieser Einsicht wurde in den folgenden Versuchen nur neutrales Chaulmoograöl zur Injektion verwendet.

#### VERSUCH.

Zur Injektion wurde eine 5%ige Emulsion des neutralen Chaulmoograöls nach Verfassers eigener Methode (1940 a) hergestellt. Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen gebraucht und ihnen wurde die Injektion von 2 ccm pro kg. Körpergewicht täglich einmal, zehn Tage lang fortgesetzt gegeben. Das Blut wurde vor und 24 Stunden nach der Injektion mit einer Spritze, die vorher zu einem Zehntel der zu entnehmenden Blutmenge mit 5%igem Natriumcitrat gefüllt war, mittels Herzpunktion entnommen. Die Phosphorverbindungen im Blut wurden in

anorganischen, Lipoid-, Eiweiss- und Esterphosphor geteilt und an dem ganzen Blut und dem Blutplasma bestimmt. Die Menge des Eiweissphosphors wurde nach folgendem Schema ermittelt: Gesamt-P—Lipoid-P—(Rest-P—Lipoid-P im Rest-P). Den Esterphosphor erhielt man nach dem Schema: Rest-P—anorg-P—Lipoid-P im Rest-P, er stellt ein Ganzes von Diphosphoglyzerinsäure, Adenylsäure, und Hexosediphosphorsäure dar. Also wurde wirklich nur die Bestimmung des Gesamt-, des anorganischen, des Lipoid-, des Rest-P, und Lipoid-P, der in Rest-P enthalten war, durchgeführt; die anderen Mengen wurden nach der oben erwähnten Weise ausgerechnet. Das ganze Blut war das Zitratblut, welches nach der Entnahme zur Genüge gemischt war; das Blutplasma wurde durch zentrifugale Fällung des Zitratblutes erhalten. Die Enteiweissung wurde mit Trichloressigsäure angestellt: in ihre 10%ige Lösung von 16 ccm tropfte man 4 ccm des Zitratblutes oder -plasmas hinein und liess direkt nach der Mischung zentrifugieren und entfernte die flüssige Oberschicht, um endlich die Bestimmung ausführen zu können.

Der Gesamtphosphor des ganzen Blutes wurde an 1,0 ccm Zitratblut, das im Verhältnis von 1:10 verdünnt war, der Gesamtphosphor des Blutplasmas an 1,0 ccm Zitratplasma, der anorganische Phosphor sowohl des ganzen Blutes wie auch des Blutplasmas an ihrem enteweissten 5 ccm Liquide, der Rest-Phosphor eben sowohl des ganzen Blutes wie auch des Blutplasmas an ihrem enteweisstem 5 ccm Liquide, der Lipoidphosphor an 1 ccm des ganzen Blutes oder des Zitratplasmas, das zuerst mit 20 ccm der gleichmässigen Mischung von Äther und Alkohol, dann wieder mit wasserfreiem Äther ausgelaugt war, und endlich der Lipoidphosphor im Rest-Phosphor des ganzen Blutes wie auch des Blutplasmas an ihrem enteweisstem 5 ccm Liquide, der ebenfalls mit 100 ccm der Äther-Alkohol-Mischung (1:1), dann wieder mit wasserfreiem Äther ausgelaugt war, jeder nach Verfassers Methode (1938) bestimmt.

#### *A. Bei normalen Kaninchen.*

Die durchschnittliche Phosphormenge der Phosphorverbin-

dungen im Blut der normalen 8–12 Kaninchen stellten sich als folgende heraus.

TABELLE I.

	Vollblut mg%	Blutplasma mg%
Anorg.-P	11,302	6,262
Lipoid-P	8,499	6,728
Ester-P	22,365	0
Eiweiss-P	70,182	6,493

*B. Bei den mit Chaulmoograöl und den als Kontrolle mit Olivenöl injizierten Kaninchen.*

1) Anorganischer Phosphor.

Die Kaninchengruppe, bei welcher der Versuch mit der Injektion des Chaulmoograöls angestellt worden ist, zeigt eine Verminderung des anorganischen Phosphors nicht nur im Blut, sondern (nur mit einer Ausnahme von Kaninchen III) auch im Blutplasma. Dagegen bei den Kaninchen der Kontrolle, denen Olivenöl injiziert worden war, ist sowohl im ganzen Blut wie auch im Blutplasma eine Zunahme an anorganischem Phosphor zu verzeichnen.

TABELLE II.

venöse Injektion	Kaninchen Nr.	Vollblut		Blutplasma	
		vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%	vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%
Chaulmoograöl	I	13,394	8,860	8,338	6,462
	II	10,976	5,263	4,922	3,022
	III	9,795	7,875	4,380	4,479
	IV	13,043	8,072	5,857	4,528
		vermindert	4,285	vermindert	1,252
Olivöl	V	7,432	12,600	6,595	6,940
	VI	10,657	15,394	7,851	9,081
		vermehrt	4,953	vermehrt	0,787

## 2) Lipoidphosphor.

Alle Kaninchen, die die Injektion des Chaulmoograöl erhalten haben, nehmen überall am Lipoidphosphor zu. Das ist, mit einer Ausnahme des Kaninchens III, auch der Fall mit demselben im Blutplasma. Dagegen lässt sich bei den Kaninchen, welche die Injektion des Olivöls bekommen haben, im ganzen Blut wie im Blutplasma eine allgemeine Verminderung des Lipoidphosphors beobachten. Danach versteht es sich von selbst, dass die Injektion des Chaulmoograöls, ganz im Gegenteil zu anorganischem Phosphor, die Vermehrung des Lipoidphosphors im Blut, die Injektion des Olivöls dagegen seine Verminderung verursacht.

TABELLE III.

venöse Injektion	Kaninchen Nr.	Vollblut		Blutplasma	
		vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%	vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%
Chaulmoograöl	I	9,244	10,533	5,576	6,671
	II	8,367	9,641	5,365	8,338
	III	7,260	7,678	6,173	5,759
	IV	7,137	9,549	5,980	8,023
		vermehrt 1,353		vermehrt 1,288	
Olivöl	V	10,582	9,352	7,137	5,414
	IV	8,773	7,186	7,751	7,742
		vermindert 1,458		vermindert 0,766	

## 3) Die zeitlichen Veränderungen des anorganischen und des Lipoidphosphors bei einmaliger Injektion des Chaulmoograöls.

Aus der ersten und zweiten Betrachtung erkennt man, dass eine über eine lange Zeit sich erstreckende intravenöse Injektion des Chaulmoograöls einerseits eine Verminderung des anorganischen Phosphors, andererseits eine Vermehrung des Lipoidphosphors mit sich bringt. Allein die Veränderungen des anorganischen und Lipoidphosphors, welche sich bei fortgesetzter Injektion des Chaulmoograöls zeigen, ergeben bei einmaliger Injektion ein ganz anderes Bild, indem sie beide fast die gleiche Abnahme aufweisen. Wenn man nämlich die 5%ige Emulsion des Chaulmoogra-



öls je 2 cem pro kg. Körpergewicht intravenös injiziert, so nehmen sie 1-2 Stunden danach ab, aber vier Stunden später etwas zu und acht Stunden später wieder etwas ab; sie erlangen 24 Stunden später den normalen Wert wieder.

TABELLE IV.

venöse Injektion	Kaninchen Nr.	vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%	2 St. mg%	4 St. mg%	8 St. mg%	24 St. mg%
Vollblut anorg.-P	VII	13,905	11,321	11,321	12,182	10,644	14,828
	VIII	11,444	10,890	9,965	12,642	8,429	14,705
	IX	11,813	8,060	8,860	11,136	8,367	9,290
	X	11,321	10,090	9,229	10,607	10,275	10,937
			vermind. 1,320	vermind. 2,277	vermind. 0,479	vermind. 2,692	vermehrt 0,320
Vollblut lipoid-P	VII	6,546	6,251	4,503	6,595	5,795	6,546
	VIII	8,417	5,291	6,202	9,499	9,573	8,564
	IX	8,613	7,629	5,783	7,850	7,924	8,200
	X	8,170	5,931	5,512	7,727	6,645	8,988
			vermind. 1,661	vermind. 2,436	vermind. 0,019	vermind. 0,452	vermehrt 0,096

#### 4) Esterphosphor.

Er wird bei den Kaninchen, welche die Injektion des Chaulmoograöls bekommen haben, ab- und bei solchen, welche die Injektion des Olivöls bekommen haben, zunehmen.

TABELLE V.

venöse Injektion	Kaninchen Nr.	Vollblut	
		vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%
Chaulmoograöl	I	26,371	12,126
	II	19,887	19,649
	III	18,114	15,998
	IV	24,945	14,078
		vermindert 6,867	
Olivöl	V	22,643	24,612
	VI	19,756	20,932
		vermehrt 1,573	

## 5) Eiweissphosphor.

Der Eiweissphosphor sowohl im ganzen Blut wie auch im Blutplasma zeigt bei den Kaninchen, denen die Injektion des Chaulmoograöls gegeben worden ist, die Neigung zur Vermehrung, dagegen bei denen, die die Injektion des Olivöls bekommen haben, die Neigung zur Verminderung.

TABELLE VI.

venöse Injektion	Kaninchen Nr.	Vollblut		Blutplasma	
		vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%	vor Injekt. mg%	nach Injekt. mg%
Chaulmoograöl	I	54,725	61,241	7,088	10,608
	II	54,292	64,991	4,215	7,922
	III	82,964	118,921	4,757	6,005
	IV	55,021	67,385	7,457	7,181
		vermehrt 17,964		vermehrt 2,050	
Olivöl	V	88,303	73,242	6,744	6,744
	VI	97,536	75,592	6,243	3,600
		vermindert 18,502		vermindert 1,321	

## SCHLUSS

Wenn man den Kaninchen das Chaulmoograöl in der für den Menschenkörper angewandten Dosis täglich einmal zehn Tage lang fortgesetzt injiziert, so wirkt es auf die im Blut enthaltenen Phosphorverbindungen anders als das Olivöl ein. Es lässt sich nämlich einerseits die Neigung zur Verminderung von anorganischem und Ester-Phosphor, andererseits die Neigung zur Vermehrung von Lipoid- und Eiweiss-Phosphor bestätigen.

Diese Untersuchung wurde mittels finanzieller Unterstützung vom Japanischen Unterrichtsministerium für wissenschaftliche Forschung ausgeführt.

## LITERATUR.

- Koyanagi (1938): J. Biochem., 28, 371.  
 Koyanagi (1940 a): J. Biochem., 31, 109.  
 Koyanagi (1940 b): J. Biochem., 32, 317.

## ÜBER DAS SCHICKSAL DER TRIOXY-BUFOSTERO- CHOLENSÄURE IM MEERSCHWEINCHEN- ORGANISMUS.

VON

KANZI IWAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut der Med. Fakultät Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. November 1941)

Durch Untersuchung verschiedener Gallen im hiesigen Institut wurden verschiedene kohlenstoffreichere Gallensäuren ( $C_{26}$ ,  $C_{27}$ ,  $C_{28}$ ) und Steroide ( $C_{27}$ ,  $C_{28}$ ) aufgefunden, die als Zwischenstufe zu gewöhnlichen Gallensäuren, die in ihrem Molekül 24 Atome Kohlenstoff enthalten, betrachtet werden konnten, wie z. B. Trioxybufosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  (Shimizu u. Oda 1934), Trioxyisosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  (Shimizu u. Kazuno 1936) aus Krötengalle, Tetraoxy-norsterocholensäure  $C_{27}H_{46}O_6$  (Ohta 1939) aus der „Gigi“-Fischgalle, Trioxy-bisnor-sterocholensäure  $C_{26}H_{44}O_5$  (Kazuno u. Kurauti 1940; Mabuti 1941) aus der Galle von *Rana Catesbina* Shaw und Tetraoxy-norbufostan  $C_{27}H_{48}O_4$  (Makino 1933), Pentaoxy-bufostan  $C_{28}H_{50}O_5$  (Kazuno 1940) aus der Krötengalle,  $\alpha$ -Seymnol  $C_{27}H_{46}O_5$  (Hammarsten 1898; Asikari 1939) aus der „Hai u. Akaei“-Fischgalle.

Wenn man in Betracht zieht, dass die chemische Konstitution dieser kohlenstoffreicheren Gallensäuren und Steroide derjenigen der Sterine, wie z. B. Dehydrocholesterin  $C_{27}H_{44}O$  oder Ergosterin  $C_{28}H_{44}O$  nahesteht, welche letztere nach Kimura (1938) durch ihre Zufuhr die Gallensäureausscheidung in der Galle der Kröten in der Tat vermehren konnte, so muss man die beiden Sterine als Muttersubstanz der gewöhnlichen kohlenstoffärmeren Gallensäuren annehmen.

Was den Uebergangsmechanismus dieser Sterine in gewöhnliche Gallensäuren anbetrifft, so wurde von Kazuno (1940) u.

Mabuti (1941) nach der Idee von Shimizu genau darüber geschrieben.

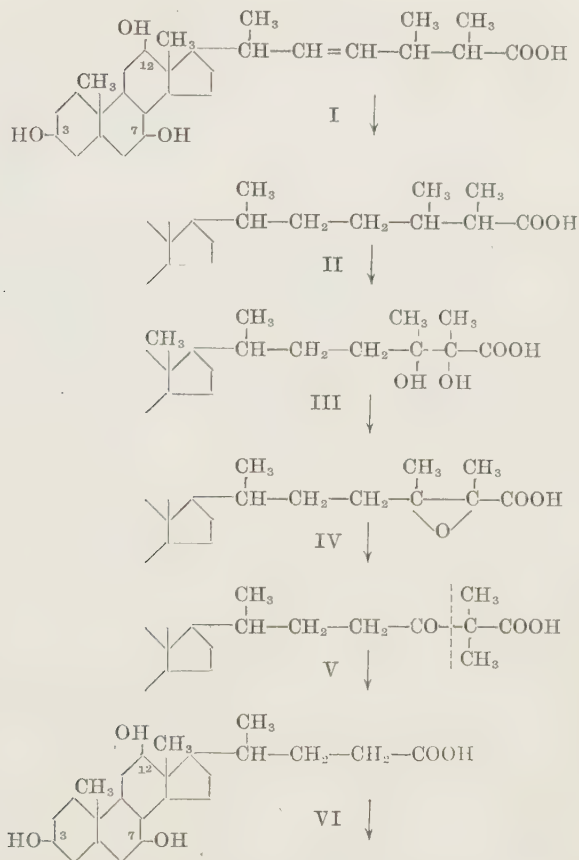
Obwohl die chemische Konstitution der verschiedenen kohlenstoffreicheren Gallensäuren und der Steroide bereits festgestellt worden ist, wurde aber ihr Schicksal im Organismus noch nicht geprüft. Somit habe ich Trioxy-bufosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  den Meerschweinchen verabreicht und ihren Harn u. Galle untersucht, welche letztere nach Imai (1937) eigentlich weder Cholsäure noch Desoxycholsäure enthalten sollte. In der Tat wurden nach der Methode von Wieland u. Seibert (1939) aus der Galle von 280 Meerschweinchen ausser Chenodesoxycholsäure und 3-Oxy-7-ketocholansäure keine anderen Gallensäuren gewonnen, wie Imai (1937) bei seinem Versuch bewiesen hat.

Aus 12,14 Liter Harn von 259 Meerschweinchen, denen insgesamt 23,2 g Trioxy-bufosterocholensäure verabreicht wurden, wurden Cholsäure und Desoxycholsäure rein erhalten, während aus der Galle (210 ccm) ausser eigentlicher Chenodesoxycholsäure und 3-Oxy-7-ketocholansäure nur unveränderte ursprüngliche Trioxy-bufosterocholensäure erhalten wurde.

Diese Tatsache zeigt, dass die verabreichte Trioxy-bufosterocholensäure im Meerschweinchenorganismus erst in Cholsäure, dann unter Oxydoreduktion weiter höchstwahrscheinlich über Redukto-dehydrocholsäure (Okasaki 1941) in Desoxycholsäure übergehen dürfte und zwar in der Weise, dass die Trioxy-bufosterocholensäure (I) erst unter Aufnahme von Wasserstoff in Trioxy-bufosterocholansäure (II) hydriert und ihre Seitenkette unter sogenannter Glykoloxydation (III u. IV) nach Shimizu u. Kazuno (1940) und weiter unter folgender  $\beta$ -Oxydation (V) abgekürzt wird, um in Cholsäure (VI) verwandelt zu werden, was dadurch unterstützt wird, dass in der Krötengalle ein Glykol, Pentaoxy-bufostan  $C_{28}H_{50}O_5$  vorkommt.

Dieses Pentaoxy-bufostan wird experimentell durch Oxydation unter Pinacolinumlagerung in Cholsäure verwandelt, wie Kazuno (1940) in seinem Versuch nachgewiesen hat.

Auf diese Weise wurde die Cholsäure im Harn von Meerschweinchen aufgefunden. Die im Harn ausgeschiedene Desoxy-



cholsäure dürfte aus Cholsäure über Reduktodehydrocholsäure (Okasaki 1941) weiter über 3-Oxy-12-ketocholensäure in Desoxycholsäure reduziert werden.

Diese Tatsache zeigt wohl, dass die Trioxy-bufosterocholensäure (I)  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_5$ , eine Zwischenstufe des Ergosterins zu einer Oxycholsäure ist. In der Tat konnte die Trioxy-bufosterocholensäure (I) im Meerschweinchenorganismus in Cholsäure übergehen.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

23,2 g Trioxy-bufosterocholensäure vom Schmelzpunkt  $160^\circ$

wurden in berechneter Menge von  $N/10$  Natronlaugelösung gelöst und mit sterilisiertem destilliertem Wasser verdünnt, bis die Lösung 1% davon enthielt. Von dieser Lösung wurden den kräftigen gesunden Meerschweinchen vom Körpergewicht 400–600 g, die eine Woche lang mit einer bestimmten Nahrung (Okara u. Gemüse) gefüttert worden waren, 2 ccm pro kg Körpergewicht und pro Tage 10 Tage lang in die Bauchhöhle einverleibt.

Während des Versuches wurde der Harn des Versuchstieres jeden Tag durch Katheterisierung gesammelt und betrug insgesamt 12,14 Liter. Die zum Versuch gebrauchten Meerschweinchen betrugen 259. 2 Tage nach der letzten Injektion wurde die Gallenblase jedes Versuchstieres herausgenommen und die Galle gesammelt. Sie betrug insgesamt 210 ccm.

#### 1) *Galle.*

Die gelblich klare, schwach alkalische Galle wurde durch Alkohol von Mucin und dann durch Adbampfen vom Alkohol befreit. Diese Lösung wurde mit Äther einige Male wiederholt extrahiert und weiter unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure (gegen Kongorot) wieder mit Äther extrahiert. Die beiden Ätherauszüge wurden mit einer 10%igen Sodalösung ausgezogen, diese Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die dabei niedergeschlagene gelblichweisse Fällung wieder in Äther aufgenommen. Der nach dem Verdampfen des Äthers erhaltene Rückstand wurde nach dem Trocknen einige Male mit Petroläther digeriert, um das Fett zu beseitigen, und wieder in trockenem Äther digeriert, um den Farbstoff zu entfernen.

Diese Masse wurde vergebens aus allen organischen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht. Somit wurde die Substanz in Methanol mit ätherischer Diazomethanolösung verestert. Der Ester wurde aus Methanol als prismatischen Nadeln erhalten. Der Schmelzpunkt war  $172^{\circ}$ . Der Krystall zeigt eine positive Hammarsten-Yamasakische Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine anfangs gelbe, dann kirschrote Farbe. Er zeigt mit reinem Trioxy-bufosterocholensäuremethylester keine Schmelzpunktdepression.



4,125 mg Subst.: 11,000 mg CO<sub>2</sub>, 3,800 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>20</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 73,05 H 10,16

Gef. „ 72,73 „ 10,31.

Die verabreichte Trioxy-bufosterocolensäure wird also zum Teil unverändert in der Galle ausgeschieden.

## 2) *Der Harn.*

12,14 Liter des gesammelten gelbbraunen schwach alkalischen Harns vom spezifischen Gewicht 1010–1028 wurden in Zimmertemperatur mittelst elektrischen Föhns verdampft und im Exsikkator gut getrocknet. Der schwarzbraune Rückstand von 185 g wurde unter Erwärmung mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade 5 mal extrahiert. Der Alkoholauszug wurde nach dem Abdampfen von Alkohol mit Wasser verdünnt und weiter vom Alkohol verdampft. Die dabei erhaltene schwarzbraune Lösung von 500 cem wurde mit 25 g Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade 3 Stunden erhitzt. Dieses Hydrolysat wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die dabei erhaltene schwarzbraune Fällung gut getrocknet. Ausbeute betrug 22 g. Diese Masse wurde mit Petroläther einige Male digeriert und dann mit getrocknetem Äther extrahiert. Hierbei wurde je eine ätherlösliche und ätherunlösliche Fraktion erhalten.

### a. Ätherlösliche Fraktion.

Aus dem Ätherauszug wurde nach dem Abdampfen des Äthers eine braune Masse erhalten, diese völlig getrocknet, erst in Petroläther, dann in getrocknetem Äther digeriert und diese Behandlung einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff völlig zu beseitigen. Dabei wurde ein gelbbraunes Pulver erhalten.

Diese Substanz wurde in 20 cem einer 5%igen Natriumcarbonatlösung gelöst, unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther durchgeschüttelt und der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser mit Pottasche getrocknet. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand in 20 cem einer 2%igen Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und von der Fällung abfiltriert.

Diese Bariumsalzfällung wurde mit einer 10%igen Natrium-

carbonatlösung umgekocht, von dem dabei ausgefällten Bariumcarbonat abfiltriert und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure in Äther aufgenommen. / Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser gut getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde mit Petroläther behandelt. Die Substanz zeigt eine positive Benzaldehydreaktion der Desoxycholsäure nach Kazirow u. Shimada (1938). Dann wurde sie in Eisessig gelöst und die dabei durch Verdünnen mit Wasser erzeugte Fällung aus verdünntem Eisessig umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 144–145°. Ausbeute 15 mg. Sie zeigen mit reiner Essigcholeinsäure keine Schmelzpunktdepression.

Andrerseits wurde die Substanz in 80%iger Ameisensäurelösung gelöst und auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde in viel Wasser eingegossen, die dabei abgeschiedene Fällung mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 193°. Sie zeigen mit reiner Diformyl-desoxycholsäure keine Schmelzpunktdepression.

3,860 mg Subst.: 9,840 mg CO<sub>2</sub>, 3,040 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> Ber. C 69,64 H 8,93

Gef. „ 69,52 „ 8,81.

Das von Bariumsalzfällung abgetrennte Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei ausgefällte gelbbraune Fällung wieder in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und unter Zusatz einer 10%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und von der Fällung abfiltriert. Diese Fällung wurde als Desoxycholsäurefraktion behandelt. Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde erst in Petroläther, dann in getrocknetem Äther digeriert, um den Farbstoff zu entfernen. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt.

Das dabei erhaltene gelblichweisse Pulver betrug 0,2 g. Dieses Pulver wurde in Methanol mit ätherischer Diazomethanolösung verestert und der Ester aus Methanol umkrystallisiert. Lange Nadeln vom Schmelzpunkt 147°. Ausbeute 5,0 mg. Diese wurde

mit einer 5%igen alkoholischen KalilaugeLösung 2 Stunden lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach dem Verdampfen des Alkohols mit Wasser verdünnt und mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde getrocknet und in Äther aufgenommen.

Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und im Zimmer verdunsten gelassen. Der dabei abgeschiedene Krystall wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Oktaedrischer Krystall vom Schmelzpunkt  $198^{\circ}$ . Er zeigt mit reiner Cholsäure keine Schmelzpunktdepression.

b) Ätherunlösliche Fraktion.

Diese Fraktion wurde nach Vertreibung des Äthers in 50 ccm Alkohol gelöst, mittelst Petroläthers einige Male geschüttelt, um das Fett zu entfernen, mit 2,5 g Natronlauge versetzt und eine Stunde lang auf dem Wasserbade hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach dem Verdampfen des Alkohols unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther geschüttelt. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und vom Äther abgedampft, wobei ein gelbbrauner Niederschlag auftrat.

Dieser Niederschlag wurde nach dem Trocknen erst in Petroläther, dann mit wasserfreiem Äther digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Die gelbweisse Substanz wurde in Alkohol einige Tage stehen gelassen. Dabei schied sich ein oktaedrischer Krystall ab. Der Krystall zeigt eine positive Myliusche und Hammarstensehe Reaktion und schmilzt bei  $198^{\circ}$ . Er zeigt mit reiner Cholsäure keine Schmelzpunktdepression. Ausbeute 5 mg.

3,830 mg Subst.: 9,880 mg  $\text{CO}_2$ , 3,310 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$  Ber. C 70,53 H 9,87

Gef. „ 70,35 „ 9,67.

3) *Die Gallensäure aus der normalen Galle von Meerschweinchen.*  
(Kontrollversuch).

140 ccm Galle aus 280 Gallenblasen von Meerschweinchen wurden durch Alkohol von Mucin befreit, von Alkohol abgedampft und erst mit Petroläther, dann mit Äther durchgeschüttelt. Diese

Lösung wurde mit Kalilaugelösung versetzt, bis die Lösung 10% davon enthielt, und auf dem Sandbad 30 Stunden lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert, wobei die sauren Substanzen in Äther aufgenommen wurden. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser gut getrocknet und verdampft. Der harzige Rückstand wurde in Petroläther digeriert, um das Fett zu entfernen, in 100 ccm Äther gelöst und eine Woche lang stehen gelassen, wobei sich an der Wand des Gefäßes ein Krystall abschied. Der Krystall wurde aus Essigäther abermals umkrystallisiert. Schmelzpunkt 202–203°. Keine Schmelzpunktdepression mit 3-Oxy-7-ketocholansäure. Ausbeute 0,1 g.

2,285 mg Subst.: 6,220 mg CO<sub>2</sub>, 2,020 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> Ber. C 73,79 H 9,81

Gef. „ 74,24 „ 9,89.

Die von 3-Oxy-7-ketocholansäure befreite Ätherlösung wurde verdampft, wobei ein Öl zurückblieb. Dieses Öl wurde in 200 ccm Äther gelöst und die Lösung mit 10 ccm einer 15%igen Salzsäure einige Male geschüttelt. Diese Salzsäurelösung wurde im Vakuum eingengt, aber hierbei keine Cholsäure aufgefunden, sondern nur ein nichtkrystallisiertes Öl gewonnen. Die von der Cholsäurefraktion getrennte Ätherlösung wurde mit einer 25%igen Salzsäurelösung geschüttelt. Diese Salzsäurelösung wurde mit viel Wasser verdünnt, die dabei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und verdampft, wobei ein harziges Öl zurückblieb.

Dieses Öl wurde wieder in einer adequate Menge Äther gelöst und stehen gelassen. Dabei schied sich ein Krystall an der Wand des Gefäßes ab. Dieser Krystall wurde abfiltriert und aus Essigäther umkrystallisiert. Schmelzpunkt 202–203°. Mit reiner 3-Oxy-7-ketocholansäure keine Schmelzpunktdepression. Ausbeute 10 mg.

Die durch 25%ige Salzsäure wiederholt von Oxyketosäure befreite Ätherlösung wurde verdampft, der Rückstand in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und unter Zusatz einer 10%igen Bariumchloridlösung ausgefällt, wobei sich Bariumsalz krystallinisch abschied. Dieser Krystall wurde abfiltriert und aus Alkohol um-

krystallisiert. Dieses Bariumsalz wurde durch Kochen mit Natriumcarbonatlösung in Natriumsalz verwandelt. Diese Natriumsalzlösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Der Ätherauszug wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und verdampft, wobei ein weisses Pulver erhalten wurde. Der Schmelzpunkt war 135°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Chenodesoxycholsäure. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt sich eine violettrote Farbe. Ausbeute 0,3 g.

Diese Substanz wurde in 5 ccm reiner Ameisensäurelösung auf dem Wasserbade 6 Stunden lang erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde in eine grosse Menge von Wasser eingegossen. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert, der Schmelzpunkt war 182–183°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformylchenodesoxycholsäure.

4,245 mg Subst.: 10,810 mg CO<sub>2</sub>, 3,362 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> Ber. C 69,64 H 8,93

Gef. „ 69,50 „ 8,80.

Die Ätherlösung, die durch Schütteln mit 10%iger oder 25%iger Salzsäure von 3-Oxy-7-ketocholansäure und Chenodesoxycholsäure befreit wurde, wurde nach Waschen mit Wasser getrocknet und verdampft.

Dabei wurde aber keine andere Gallensäure, sondern nur eine minimale Menge von Öl erhalten.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. T. Kazuno für seine freundliche Leitung und Unterstützung bei meiner Arbeit, und der japanischen Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen und industriellen Forschung für die zur Verfügung gestellten Mitteln meiner herzlichen Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

Hammarsten, O. (1898): Z. Physiol. Chem., **24**, 322;

Asikari, H. (1939): J. of Bioch., **23**, 319.

Imai, I. (1937): Z. Physiol. Chem., **243**, 65.

Kazuno, T. (1940): Z. Physiol. Chem., **266**, 11.

Kaziro, K. u. Shimada, T. (1938): Z. Physiol. Chem., **254**, 57.

Kimura, T. (1938): Z. Physiol. Chem., **253**, 47.

- Kurauti, Y. u. Kazuno, T. (1940): Z. Physiol. Chem., **262**, 56;  
Mabuti, H. (1941): J. of Bioch., **33**, 117 u. 131.  
Mabuti, H. (1941): J. of Bioch., **33**, 120.  
Makin●, H. (1933): Z. Physiol. Chem., **220**, 49.  
Ohta, K. (1939): Z. Physiol. Chem., **259**, 53.  
Okasaki, Y. (1941): J. of Bioch., **34**, 83.  
Shimizu, T. u. Oda, T. (1934): Z. Physiol. Chem., **227**, 74.  
Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Z. Physiol. Chem., **239**, 67.  
Shimada, T. (1938): J. of Bioch., **28**, 169.  
Wieland, H. u. Seibert, W. (1939): Z. Physiol. Chem., **262**, 1.



## ÜBER DAS SCHICKSAL DER TRIOXY-ISOSTERO- CHOLENSÄURE IM KANINCHENORGANISMUS.

VON

KANZI IWAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut der Med. Fakultät Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. November 1941)

Beim Versuch (Iwaki 1941) mit Trioxy-bufosterocholensäure wurde bereits festgestellt, dass im Meerschweinchenorganismus die verabreichte Trioxy-bufosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  erst in Cholsäure  $C_{24}H_{40}O_5$ , dann in Desoxycholsäure verwandelt wird, was zeigt, dass die kohlenstoffreichere Gallensäure eine Muttersubstanz der kohlenstoffärmeren gewöhnlichen Gallensäure ist. Um dies festzustellen, wurden bereits verschiedene Versuche mit verschiedenen Tieren ausgeführt. Da die Cholsäure als ein erstes Abbauprodukt aus höheren Gallensäuren betrachtet wird, so wurden als Versuchstiere zuerst Meerschweinchen ausgewählt, da die Galle dieses Tieres nur 3-Oxy-7-ketocholansäure und Chenodesoxycholsäure enthält, soweit bis heute viele Autoren (Imai 1937 u. Iwaki 1941) festgestellt haben. Die Galle des Meerschweinchens muss eigentlich auch Cholsäure enthalten, dessen Menge aber vielleicht so gering ist, dass man sie mit der gewöhnlichen Methode kaum nachweisen konnte.

Daher ist es nicht zweckentsprechend, für den Versuch Kaninchen zu benutzen, da nach Windaus u. Schoor (1928), Kishi (1936) u. Sekitoo (1931) die Kaninchengalle Cholsäure u. Desoxycholsäure und ihre Isomere enthalten kann, während nach Okamura (1930) in der Fistelgalle des Kaninchens hauptsächlich Cholsäure ausgeschieden wird.

Doch habe ich das Kaninchen als Versuchstier gebraucht, um zu sehen, ob die verabreichte kohlenstoffreichere Gallensäure durch Abbau als andere Gallensäure im Harn ausgeschieden werden kann.

Somit wurde hier die Trioxy-isosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  den

Kaninchen intravenös verabreicht und ihr Harn u. Galle untersucht und gefunden, dass die verabreichte Trioxy-isosterocolensäure zum Teil unverändert in der Galle vorgefunden wird. Im Harn wurde weder Cholsäure u. Desoxycholsäure noch ursprüngliche Gallensäure vorgefunden, sondern eine Aminosäure *l*(+)-Tyrosin gewonnen, was dadurch bedingt zu sein scheint, dass durch Zufuhr einer grösseren Menge der Gallensäure die Leber vergiftet worden war, wie Jacoby (1900) bei Phosphorvergiftung beobachtet hat.

Die negative Ausscheidung der Cholsäure und Desoxycholsäure, die aus der verabreichten Trioxy-isosterocolensäure im Kaninchenorganismus gebildet werden sollten, weist höchstwahrscheinlich darauf hin, dass die gewöhnliche Gallensäure wohl im Organismus gut assimiliert und nicht im Harn ausgeschieden wird, da in der Kaninchengalle immer Cholsäure und Desoxycholsäure vorkommen.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

15,8 g Trioxy-isosterocolensäure vom Schmelzpunkt  $227^{\circ}$  wurden in berechneter Menge der *N*/10 Natronlauge (341.28 ccm) gelöst und mit sterilisiertem destilliertem Wasser verdünnt, bis die Lösung 1% davon enthielt. 3 ccm dieser Lösung pro kg wurden kräftigen, gesunden Kaninchen vom Körpergewicht 2.0–2.5 kg, die vor dem Versuch eine Woche lang mit einer bestimmten Nahrung (Okara u. Gemüse) gefüttert worden waren, täglich einmal intravenös 10 Tage lang verabreicht. 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen (30) getötet und ihre Gallenblasen herausgenommen. Die gesammelte Galle betrug 70 ccm und der während der Injektion gesammelte Harn 16 Liter. Diese Galle und der Harn wurden in folgender Weise behandelt.

##### 1. Die Galle.

70 ccm der dunkelgrünen klebrigen schwach sauren Galle wurden durch Alkohol von Mucin befreit, von Alkohol abgedampft und entweder als solche oder unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther einige Male geschüttelt.

Der vereinigte Ätherauszug wurde mit einer 10%igen Natrium-

carbonatlösung geschüttelt, diese Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung getrocknet. Diese Masse wurde wieder in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser gut getrocknet und verdampft. Der getrocknete Rückstand wurde einige Male in Petroläther digeriert und wieder in Äther gelöst. Beim Verdunsten der Ätherlösung schied sich ein weisser Krystall ab.

Der Krystall wurde aus Methanol umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt  $227^{\circ}$ . Diese zeigen eine positive Hammarsten-Yamasakische Reaktion. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Trioxy-isosterocholensäure. Ausbeute 0,5 g.

3,67, 3,68 mg Subst.: 9,215, 9,781 mg  $\text{CO}_2$ , 3,335, 3,285 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_5$	Ber. C	72,68	H	10,02
	Gef. „	72,19	72,49	„ 10,17 9,99.

## 2. Der Harn.

16 Liter des schwarzbraunen schwach alkalischen Harns vom spez. Gewicht 1018–1028 wurden in Zimmertemperatur mit elektrischem Föhn verdampft und im Exsikkator völlig getrocknet. Dabei wurde ein schwarzbrauner Rückstand von 577 g erhalten.

Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol unter 6 stündiger Erwärmung auf dem Wasserbad 5 mal extrahiert. Der Alkoholauszug wurde verdampft, unter Wasserzusatz weiter der Alkohol abgedampft und die dabei erhaltene schwarzbraune Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther 4 mal durchgeschüttelt. Die Lösung wurde mit Sodalösung neutralisiert und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure wieder mit Äther ausgeschüttelt. Die beiden Ätherauszüge wurden mit einer 5%igen Sodalösung ausgeschüttelt und in je eine Sodalösungsfraction und eine Ätherlösungsfraction getrennt.

### a. Sodalösungsfraction.

Die Sodalösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei entstandene Fällung mit Äther ausgezogen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und verdampft.

Die schwarzbraune klebrige Masse wurde in Petroläther abermals digeriert, weiter mit Äther behandelt und der Ätherauszug nach dem Verdampfen wieder in Petroläther digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Doch war die Substanz so schmutzig braun und so schmierig, dass man sie nicht in Krystallform bringen konnte. Somit wurde die Substanz in 2%igem Ammoniak gelöst, unter Zusatz einer 10%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und nach einer Nacht abfiltriert.

(i) Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde in Petroläther digeriert, der rotbraune Rückstand gut getrocknet und wieder mit Äther ausgezogen.

Dieser Ätherauszug wurde mit einer 20%igen Sodalösung ausgeschüttelt. Diese Sodalösung wurde eingengt und stehen gelassen. Doch schied sich kein Krystall ab. Somit wurde die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure in Äther aufgenommen und in Petroläther digeriert. Diese Behandlung wurde abermals wiederholt. Die dabei zurückgebliebene gelblich weisse Masse wurde aus verschiedenen Lösungsmitteln vergebens umzukrystallisieren versucht. Daher habe ich die Masse in Aceton gelöst und unter Zusatz einer gleichen Menge Benzol durch eine Säule von Aluminiumoxyd nach Brockmann einlaufen lassen. Die Säule wurde in einen oberen und unteren Teil getrennt und jeder mit absolutem Alkohol abermals extrahiert. Der Alkohol-extrakt wurde eingengt, der Alkohol abgedampft und die dabei zurückgebliebene Masse mit verschiedenen Mitteln umkrystallisiert. Doch wurde kein Krystall gewonnen. Das durch die Säure eingelaufene Filtrat wurde zum Trocknen eingengt und in Essigäther stehen gelassen. Der dabei abgeschiedene Krystall wurde aus Methanol-Wasser abermals umkrystallisiert. Glänzende büschelförmige Nadeln vom Schmelzpunkt  $290^{\circ}$ . Sie zeigen Hofmannsche Reaktion und sind stickstoffhaltig. Mit reinem *l*-Tyrosin keine Schmelzpunktdepression. Ausbeute 5 mg.

(ii) Bariumsalzfällung. Die Fällung wurde mit 5%iger

Sodalösung auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt, die vom Bariumcarbonat abfiltrierte Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Äther aufgenommen und nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen verdampft. Der Rückstand wurde in Petroläther digeriert. Die dabei zurückgebliebene gelblich weisse klebrige Masse wurde vergebens mit allen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht.

b. Ätherlösungsfraktion.

Die Ätherlösung wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche verdampft und in Petroläther digeriert. Dabei wurde 15 g einer rotbraunen Masse erhalten. Diese wurde mit 5%iger alkoholischer Kalilauge auf dem Wasserbade 3 Stunden hydrolysiert. Von abfiltrierten Hydrolysat wurde unter Zusatz eines gleichen Volumens Wasser vom Alkohol abgedampft, mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde mit 10%iger Sodalösung extrahiert.

Die Sodalösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, wobei eine milchige Trübung entstand. Diese Lösung wurde mit Äther ausgeschüttelt, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche verdampft und der Rückstand nach Digerieren mit Petroläther aus allen möglichen organischen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht. Dabei wurde nur eine gelblich weisse schmierige Masse erhalten.

LITERATUR.

- Imai, I. (1937): Z. Physiol. Chem., **248**, 65.  
Iwaki, K. (1941): J. of Bioch., **35**, 139.  
Jacoby, M. (1900): Z. Physiol. Chem., **30**, 174.  
Kishi, S. (1936): Z. Physiol. Chem., **238**, 210.  
Okamura, T. u. S. (1930): Z. Physiol. Chem., **188**, 16.  
Sekitoo, T. (1931): Z. Physiol. Chem., **199**, 225.  
Windaus, A. u. Schoor, A. van (1928): Z. Physiol. Chem., **173**, 320.





## ÜBER DIE ALLIGATORSCHILDKRÖTENGALLE (III).

### Über die chemische Konstitution des Trioxy-sterocholansäurelaktons.

VON

TUTOMU KANEMITU.

(Aus dem Biochemischen Institut Med. Fakultät Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1941)

Vor einigen Jahren haben Yamasaki u. Yuuki (1936) ein Lakton aus der Galle von Alligatorschildkröten isoliert und als Trioxy-sterocholansäurelaktone bezeichnet. Das Lakton soll die Zusammensetzung  $C_{27}H_{44}O_5$  bzw.  $C_{28}H_{46}O_5$  haben, bei  $208^\circ$  schmelzen und durch Hydrolyse mit Alkalilauge zu einer Säure vom Schmelzpunkt  $140^\circ$  aufgespalten und durch Erhitzen mit einer kleinen Menge von Lösungsmitteln in das ursprüngliche Lakton zurückverwandelt werden. Das Lakton enthält drei sekundäre Alkoholgruppen und soll in einer nahen Beziehung zur Trioxy-bufosterocholansäure nach Shimizu u. Oda (1934) stehen. Es wird also ebenfalls als eine Zwischenstufe zwischen dem Sterin und der Gallensäure von 24 Kohlenstoffatomen betrachtet. Ich habe das Thema wieder aufgenommen, um die Konstitution des Laktone festzustellen.

Das aus der Galle von Alligatorschildkröten nach Yamasaki u. Yuuki (1936) hergestellte Lakton vom Schmelzpunkt  $208^\circ$  wurde durch Erwärmen in  $N/2$  Natronlauge gelöst und aus dieser Lösung durch Ansäuern mit Mineralsäuren eine Säure, Tetraoxy-sterocholansäure, vom Schmelzpunkt  $149-150^\circ$  erhalten, die durch Erhitzen in Ameisensäurelösung oder beim Stehen in einer Kameleonlösung leicht in ursprüngliches Lakton vom Schmelzpunkt  $208^\circ$  zurückverwandelt wird.

Dieses Lakton vom Schmelzpunkt  $208^\circ$  oder Tetraoxy-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt  $156-157^\circ$  wird durch

Erwärmen in Ameisensäurelösung in Trioxy-sterocholansäurelaktontriformiat verwandelt, welches durch Hydrolyse mit einer 10%igen KalilaugeLösung Tetraoxy-sterocholansäure liefert. Diese Säure gibt auch beim Behandeln mit Ameisensäure dasselbe Formiat, was zeigt, dass bei der Bildung des Triformiats aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester erst das Methanol durch Ameisensäure abgespalten, dann freie Tetraoxy-sterocholansäure in ihr Laktontriformiat verwandelt wird.

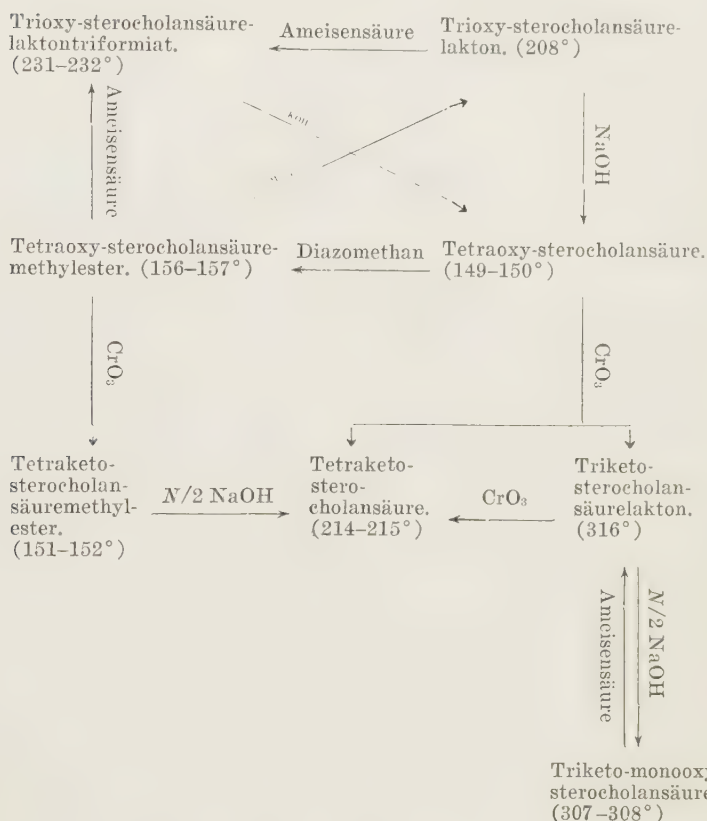
Bei der Oxydation mit Chromsäure liefert die Tetraoxy-sterocholansäure gleiche Mengen des Triketolaktons vom Schmelzpunkt 316° und der Tetraketosterocholansäure vom Schmelzpunkt 214–215°. Das Triketolakton wird weiter durch Oxydation mit Chromsäure in Tetraketo-sterocholansäure vom Schmelzpunkt 214–215° verwandelt und das erstere Lakton und die letztere Säure liefern Trioxim, was zeigt, dass das Lakton drei sekundäre Alkoholgruppen im Kern des Sterocholansäureskelettes und eine in der Seitenkette der Sterocholansäure hat.

Tetraoxy-sterocholansäuremethylester liefert bei der Oxydation mit Chromsäure einen Tetraketoester vom Schmelzpunkt 151–152°, welcher aber ein Trioxim und durch Hydrolyse mit  $N/2$  NaOH Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 214–215° liefert. Diese Säure ist identisch mit der durch Oxydation mit Chromsäure aus Tetraoxy-sterocholansäure gewonnenen. Diese obenerwähnten Daten werden in Figur 1 verzeichnet.

Weder beim Erwärmen ihrer Eisessiglösung mit Salzsäure noch beim Erwärmen ihrer 10%igen Natriumcarbonatlösung und ihrer Ameisensäurelösung wurde aber die Umlagerung der Tetraketo-sterocholansäure (II) beobachtet, wie es bei der  $\alpha$ -Dehydrohyodesoxycholsäure (Windaus 1923) der Fall war.

Dies zeigt, dass das Lakton (I) vom Schmelzpunkt 208° keine sekundäre Alkoholgruppe in der Stellung an C<sub>6</sub> des Laktonmoleküls hat. Bei langem Erhitzen der Tetraketo-sterocholansäure (II) in konzentrierter Alkalilösung wurde aber eine isomere Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 111–113° erhalten, die als Iso-tetraketo-sterocholansäure (IV) bezeichnet wurde. Diese Isomerisierung der Tetraketosäure dürfte höchstwahrscheinlich auf der durch Enolisie-

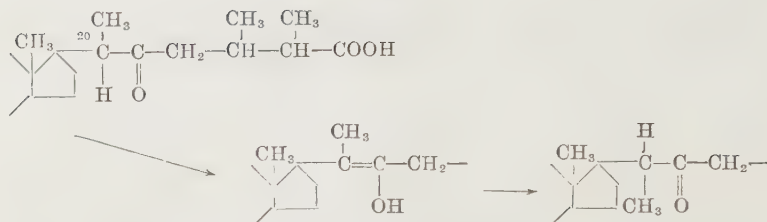
Fig. 1.



rung mit Alkali bedingten Waldenschen Umlagerung am  $C_{20}$  der Seitenkette beruhen, wie Wieland, Schlichting u. Jacobi (1926) bei der Umlagerung der  $\alpha$ -Bisnor-cholansäure mit Alkali in ihre  $\beta$ -Säure beobachtet haben, was sich aus Figur 2 ersehen lässt.

Aus dem Triketolaktone vom Schmelzpunkt 316° (III) wurde durch Hydrolyse mit Alkali eine Monoxy-triketo-steroidsäure (V) vom Schmelzpunkt 307–308° gewonnen, aus deren Methylester (VI) durch Oxydation mit Chromsäure ein Tetraketosteroidsäuremethylester (VII) gewonnen wurde, welcher sowohl mit dem

Fig. 2.



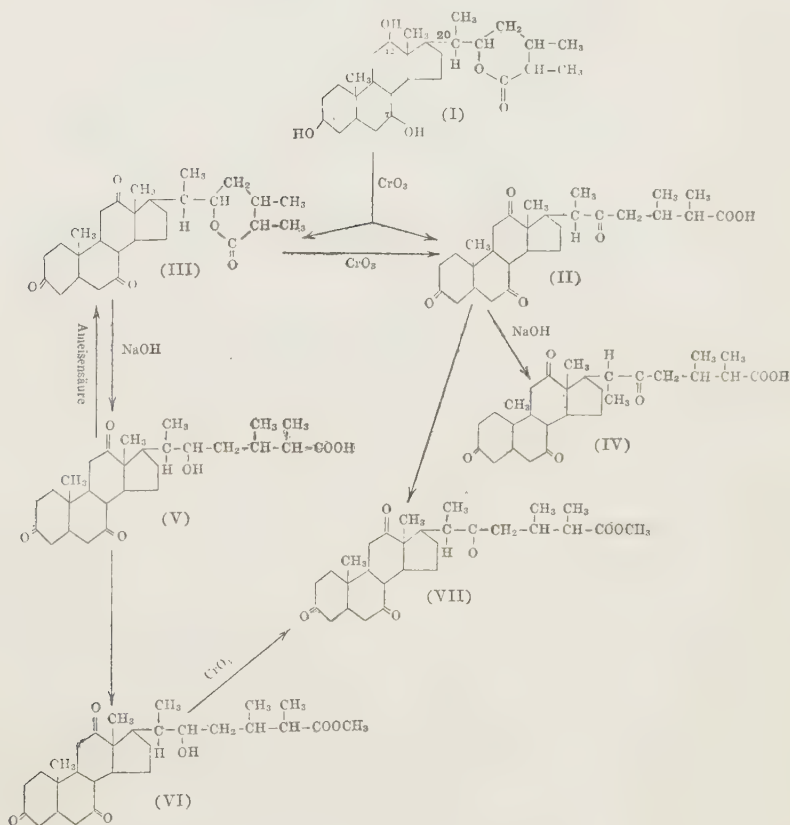
aus ursprünglichem Lakton vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$  erst durch Oxydation mit Chromsäure, dann durch Veresterung gewonnenen Tetraketo-sterocholansäure (II) methylester als auch mit dem Ester identisch ist, der aus der Tetraoxy-sterocholansäure erst durch Veresterung mit Diazomethan, dann durch Oxydation mit Chromsäure gewonnen wurde, wie sich aus Figur 1 ersehen lässt.

Diese auf verschiedenem Wege hergestellten Tetraketosäure-ester liefern nicht Tetraoxim sondern immer Trioxim, was höchstwahrscheinlich dadurch bedingt zu sein scheint, dass bei der Oxim-bildung aus Tetraketo-sterocholansäuremethylester erst Ketolakton und dann aus diesem Trioxim gebildet wird.

Die Tetraketo-sterocholansäure (II) vom Schmelzpunkt  $214\text{--}215^{\circ}$  und das Triketo-sterocholansäurelakton (III) vom Schmelzpunkt  $316^{\circ}$  wurden nach Clemmensen'scher Methode reduziert, aber aus dem Reaktionsgut kein krystallisierter Körper erhalten. Die Tetraketosäure (II) und das Triketolakton (III) wurden unter gleichen Bedingungen mit Platinoxid nach Adams und Wasserstoff reduziert, wobei ihre Ketogruppen unter Aufnahme von je vier und drei Atomen Wasserstoff reduziert wurden. Dabei wurden ebenfalls keine krystallisierten Reduktionsprodukte erhalten.

Aus den obenerwähnten experimentellen Daten scheint das Lakton vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$  (I) nicht ein  $\gamma$ -Lakton sondern ein  $\delta$ -Lakton zu sein, welches sicherlich vier sekundäre Alkoholgruppen im Molekül hat und zwar die drei im Kern und die eine in der Seitenkette des Laktonmoleküls, worüber näher in der folgenden Mitteilung gesprochen wird.

Fig. 3.



## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

I. *Trioxo-sterocholansäurelaktone*.

Ca. 5 Liter Galle von Alligatorschildkröten wurden durch Alkohol von Mucin befreit und auf dem Wasserbade der Alkohol abgedampft. In dieser Lösung wurden 500 g Kalilauge vorsichtig gelöst, bis die Lösung etwa 10% davon enthielt und auf dem Sandbade 50 Stunden lang erhitzt.

Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Chloroform fünfmal extrahiert. Dieser Chloroformextrakt wurde mit einer 10%igen Sodalösung ausgeschüttelt, um

die Säure zu entfernen, mit Wasser gewaschen, mit Pottasche entwässert und von Chloroform abdestilliert, wobei ein harzartiger Rückstand zurückblieb.

Diese Masse wurde in Petroläther digeriert, um das Fett zu entfernen, wodurch ein roher Krystall entstand. Der abgesaugte Krystall wurde aus Essigäther oder aus Aceton umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$ . Ausbeute 60 g.

Der Krystall ist in Alkohol, Methanol u. Chloroform leicht, in Essigäther, Aceton u. Eisessig schwer löslich und in Petroläther u. Wasser unlöslich.

Dieser Krystall ist erst beim Erwärmen in Sodalösung oder Natronlauge löslich. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt er anfangs gelbe, dann gelblichrote und endlich kirschrote Farbe und eine positive Hammarstensehe Reaktion.

3,120 mg Subst.: 8,290 mg  $\text{CO}_2$ , 2,796 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_6$  Ber. C 72,66 H 10,00

Gef. „ 72,46 „ 10,03

#### *Triformiate.*

0,1 g Lakton vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$  wurde in 3 ccm reiner Ameisensäurelösung gelöst und auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erhitzt, das Reaktionsgemisch in eine grosse Menge von Wasser eingegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Die Fällung wurde getrocknet und aus Methanol mehrmals umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt  $231\text{--}232^{\circ}$ .

4,250 mg Subst.: 10,581 mg  $\text{CO}_2$ , 3,171 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8$  Ber. C 68,09 H 8,49

Gef. „ 67,90 „ 8,35.

## *II. Tetraoxy-sterocholansäure auf verschiedenem*

### *Wege aus Lakton.*

(1) 1 g Trioxy-sterocholansäurelakton wurde in 5 ccm einer N/10 Natronlauge gelöst, unter Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure ausgefällt, die Fällung abgesaugt und mit Wasser gut gewaschen. Diese Fällung wurde nach dem Trocknen aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Rautenförmige Tafeln vom Schmelzpunkt



149–150° (nach Yamasaki u. Suganami 1942 Fp. 140°). Ausbeute 0,6 g. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall anfangs eine orangerote, endlich kirschrote Farbe.

3,610, 3,720 mg Subst.:	8,440, 8,687 mg CO <sub>2</sub> ,	3,190, 3,395 mg H <sub>2</sub> O.
C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub> ·2½H <sub>2</sub> O	Ber. C 63,95	H 10,10
	Gef. „ 63,76, 63,69	„ 9,89, 10,21.

(2) 0,1 g Lakton vom Schmelzpunkt 208° wurde in 15 ccm einer *N*/10 Natronlauge durch Erwärmen gelöst, die durch Ansäuerung mit einer 10%igen Salzsäurelösung abgeschiedene Fällung abgesaugt und in Essigester gelöst. Diese Essigesterlösung wurde mit einer Sodalösung ausgeschüttelt und in je eine Sodalösung und Essigesterlösung getrennt.

Aus der Sodalösung wurde durch Ansäuern mit verdünnter Essigsäurelösung ausgefällt, die abgesaugte Fällung nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Dabei wurden ebenfalls rautenförmige Tafeln vom Schmelzpunkt 149–150° in einer Ausbeute 0,03 g erhalten. Bei Liebermannscher Reaktion zeigte der Krystall eine anfangs orangerote, dann kirschrote Farbe.

Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Tetraoxy-sterocholansäure, die durch Lösen des Laktons in Natronlauge und durch Ansäuern mit Essigsäure erhalten wurde.

Die Essigesterfraktion wurde mit Wasser gewaschen, nach der Entwässerung eingeeengt, die dabei abgeschiedene Fällung abgesaugt und aus Essigester umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 208°. Ausbeute 0,025 g. Keine Schmelzpunktdepression mit dem ursprünglichen Lakton.

(3) 0,1 g Lakton vom Schmelzpunkt 208° wurde durch Erwärmen in 15 ccm einer *N*/10 Natronlauge gelöst, die durch Ansäuerung mit einer 10%igen Schwefelsäurelösung abgeschiedene Fällung abgesaugt und in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wurde mit einer Sodalösung geschüttelt und in je eine Sodalösungs- und Essigesterfraktion getrennt. Aus der Sodalösung wurde Tetraoxy-sterocholansäure und aus der Essigesterfraktion ursprüngliches Lakton in genau gleicher Weise wie vorher gewon-

nen. Die Ausbeute beträgt 0,03 g bei Tetraoxy-sterocholansäure und 0,025 g bei Trioxy-sterocholansäurelaktone.

#### OXYDATION DER TETRAOXY-STEREOCHOLANSÄURE.

##### *I. mit Kaliumpermanganat.*

2 g Tetraoxy-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 156–157° wurden in 20 ccm Aceton gelöst, mit 30 ccm einer 3%igen Kameleonlösung 20 Tage lang allmählich tropfenweise versetzt, bis die Lösung beim Stehen nicht mehr entfärbte, und weiter 5 Tage lang stehen gelassen. Vom Reaktionsgemisch wurde unter Zusatz von Natriumhyposulfitlösung auf dem Wasserbade das Aceton abgedampft und nach weiterem Zusatz einer Natriumhyposulfitlösung durch Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure gefällt. Die milchig getrübbte, durch Manganoxyd und Schwefel schwarzbraun gefärbte Lösung wurde mit Chloroform mehrmals geschüttelt. Dieser Chloroformextrakt wurde mit einer 10%igen Sodalösung extrahiert und in je eine Sodalösungsfraction und Chloroformextrakt-Fraction getrennt.

Die Sodalösung wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausbeute 0,5 g. Die getrocknete Masse wurde aus Essigester, Aceton, Methanol oder Alkohol umzukrystallisieren versucht, wobei aber kein Krystall erhalten wurde. Daher wurde die Masse in 30 ccm Aceton oder Benzol gelöst und die Lösung durch eine Säule Aluminiumoxyd (1,6 × 8 cm) nach Brockmann einlaufen gelassen. Aus dem Filtrat wurde beim Einengen eine Krystallmasse erhalten. Dieser Krystall wurde aus Essigester umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 208°. Ausbeute 0,2 g.

Der Chloroformextrakt wurde nach dem Waschen mit Wasser gut entwässert und abdestilliert. Die dabei zurückgebliebene Masse wurde aus Essigester umkrystallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 208°. Ausbeute 0,8 g. Die beiden Krystalle zeigen bei der Mischprobe keine Schmelzpunktdepression mit dem ursprünglichen Laktone vom Schmelzpunkt 208°. Aus dem Reaktionsgemisch durch Kameleonlösung wurden leider keine Oxydationsprodukte aufgefunden.

*II. mit Chromsäure.*

0,6 g Tetraoxy-sterocholansäure vom Schmelzpunkt 149–150° wurde in 20 ccm Eisessig gelöst, mit 6 ccm einer 10%igen Chromsäure-Eisessiglösung allmählich tropfenweise versetzt und 30 Minuten lang stehen gelassen. Die durch Eingiessen der Reaktionslösung ins Wasser abgeschiedene abgesaugte Fällung wurde in Chloroform gelöst, mit einer 10%igen Sodalösung geschüttelt und in zwei Fraktionen von Sodalösung und Chloroformextrakt getrennt.

Von der Sodalösung wurde auf dem Wasserbade das Chloroform abgedampft, mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die dabei abgeschiedene Fällung abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Diese Fällung wurde aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 214–215°. Ausbeute 0,15 g. Der Krystall zeigt eine positive Jaffesche Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine kirschrote Farbe. Vom Chloroformextrakt wurde nach dem Waschen mit Wasser und Wasserentziehung mit Pottasche das Chloroform abdestilliert und der Rückstand aus Aceton umkrystallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt 316°. Ausbeute 0,1 g.

Aus der Sodalösung wurde Tetraketo-sterocholansäure und aus dem Chloroformextrakt Triketo-sterocholansäurelaktone erhalten, was weiter unten genau besprochen wird.

*Tetraoxy-sterocholansäuremethylester.*

0,1 g Tetraoxy-sterocholansäure wurde in Methanol mit ätherischer Diazomethanlösung verestert. Der beim Einengen der Reaktionslösung abgeschiedene Krystall wurde aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Der Krystall sintert bei 131°, schmilzt bei 156–157° und krystallisiert in Nadeln.

3,745, 3,875 mg Subst.:	9,360, 9,715 mg CO <sub>2</sub> ,	3,310, 3,485 mg H <sub>2</sub> O.
C <sub>20</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> CH <sub>3</sub> OH	Ber. C 68,39	H 10,34
	Gef. „ 68,16, 68,38	„ 9,89, 10,04.

*Tetraketo-sterocholansäuremethylester.*

0,8 g Tetraoxy-sterocholansäuremethylester wurde in 10 ccm

Eisessig gelöst, mit einer Chromeisessiglösung (0,8 g Chromsäure in 1 ccm Wasser u. 10 ccm Eisessig) tropfenweise versetzt und 30 Minuten lang stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer grösseren Menge von Wasser verestzt, die dabei abgeschiedene Krystallmasse abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Diese Masse wurde aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 151–152°. Ausbeute 0,3 g. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine karminrote Farbe.

3,835, 3,030 mg Subst.:	9,895, 7,843 mg CO <sub>2</sub> ,	3,000, 2,270 mg H <sub>2</sub> O.
C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> ½H <sub>2</sub> O	Ber. C 70,26	H 8,75
	Gef. „ 70,37, 70,60	„ 8,75, 8,38.

#### *Tetraketo-sterocholansäure.*

0,15 g Tetraketo-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 151–152° wurde in 5 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit einer gleichen Menge von *N*-Natronlauge versetzt und auf dem Wasserbade eine Stunde lang erwärmt, wobei die Lösung eine Teefarbe mit Fluoreszenz zeigt.

Die Reaktionslösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene Fällung abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Diese Masse wurde aus Aceton-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 214–215°. Ausbeute 0,6 g. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine kirschrote Farbe. Keine Schmelzpunktdepression mit der durch Oxydation mit Chromsäure aus dem ursprünglichen Lakton gewonnenen Tetraketo-sterocholansäure.

Spec. Drehung: 0,0697 g Subst. in 5 ccm Aceton, <i>l</i> = 1 dm,
$\alpha = -0,11$ $[\alpha]_D^{28} = -7,88^\circ$ .

#### *Tetraketo-sterocholansäurelakton-trioxim.*

0,1 g Tetraketo-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 151–152° wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,2 g Natriumacetat in Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt. Die beim Einengen der Lösung abgeschiedene Krystallmasse wurde aus Alkohol-Wasser

umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 218°.

4,240 mg Subst.: 0,325 ccm N (27°, 764 mm)

$C_{28}H_{41}O_5N_3$  Ber. N 8,42 Gef. N 8,77.

*Trioxy-sterocholansäurelaktone-triformiat.*

0,1 g Tetraoxy-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 156–157° wurde in 3 ccm reiner Ameisensäure gelöst, auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erhitzt und mit einer grossen Menge von Wasser versetzt. Die dabei ausgefallenen Niederschläge wurden abgesaugt, mit Wasser gut gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag wurde aus Methanol abermals umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 231–232°. Keine Schmelzpunktdepression mit dem aus Trioxy-sterocholansäurelaktone gewonnenen Triformiat. 0,1 g dieses Triformiats wurde in kleiner Menge von Methanol gelöst, mit 10 ccm einer 10%igen Kalilauge versetzt und auf dem Wasserbade 2 Stunden lang erhitzt. Diese Reaktionslösung wurde durch Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure gefällt, die Fällung abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Diese Fällung wurde aus Aceton-Wasser abermals umkrystallisiert. Rautenförmige Tafeln vom Schmelzpunkt 149–150°. Keine Schmelzpunktdepression mit der aus Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt 208° gewonnenen Tetraoxy-sterocholansäure.

OXYDATIONSPRODUKTE DES TRIOXY-STEROCHOLANSÄURELAKTONS  
DURCH CHROMSÄURE.

4 g Trioxy-sterocholansäurelaktone wurden in 65 ccm Eisessig gelöst, mit 40 ccm einer 10%igen Chromsäureeisessiglösung allmählich tropfenweise im Laufe einer Stunde versetzt, nach einer Stunde durch Zusatz einer grossen Menge von Wasser ausgefällt und die dabei abgeschiedene Fällung nach Waschen mit Wasser in Chloroform gelöst. Durch Schütteln des Chloroformextraktes mit einer Sodalösung wurde die Chloroformlösung in zwei Fraktionen: Sodalösung und Chloroformlösung getrennt.

*I. Tetraketo-sterocholansäure.*

Von der Sodalösung wurde auf dem Wasserbade das Chloro-



form abgedampft und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die abgesaugte Fällung wurde nach Waschen mit Wasser und nach Trocknen aus Aceton-Wasser (oder Alkohol-Wasser) umkrystallisiert. Helle Prismen vom Schmelzpunkt 214–215°. Ausbeute 1,2 g. Die Krystalle zeigen eine positive Jaffesche Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine kirschrote Farbe.

3,175 mg Subst.: 8,260 mg CO<sub>2</sub>, 2,390 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>

Ber. C 71,14 H 8,53

Gef. „ 70,95 „ 8,42.

*Tetraketo-sterocholansäurelaktontrioxim.*

0,1 g Tetraketo-sterocholansäure wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,2 g Natriumacetat in Alkohol versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde eingengt und die dabei abgeschiedene Fällung aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt 220°. Bei der Mischprobe mit dem aus Tetraketo-sterocholansäuremethylester hergestellten Trioxim vom Schmelzpunkt 218° färbt sich der Krystall bei 218° und schmilzt bei 220°.

*Tetraketo-sterocholansäuremethylester.*

0,2 g Tetraketo-sterocholansäure wurde in Methanol mit ätherischer Diazomethanlösung tropfenweise versetzt und die beim Einengen abgeschiedene Krystallmasse aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 151–152°. Bei Liebermannscher Reaktion zeigen die Krystalle eine karminrote Farbe. Keine Schmelzpunktdepression mit dem durch Oxydation mit Chromsäure aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester gewonnenen Tetraketo-sterocholansäuremethylester.

3,235, 3,100 mg Subst.: 8,470, 8,118 mg CO<sub>2</sub>, 2,570, 2,356 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>

Ber. C 71,56

H 8,70

Gef. „ 71,41, 71,42 „ 8,89, 8,54.

*Tetraketo-sterocholansäurelaktontrioxim.*

0,1 g Tetraketo-sterocholansäuremethylester wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,2 g



Natriumacetat in einer alkoholischen Lösung versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt. Die dabei durch Einengen der Lösung abgeschiedene Krystallmasse wurde aus Alkohol-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt  $218^{\circ}$ .

3,410 mg Subst.: 0,252 ccm N ( $25^{\circ}$ , 753 mm)

$C_{28}H_{41}O_5N_3$  Ber. N 8,42 Gef. N 8,40.

## II. Umlagerung der Tetraketo-sterocholansäure, Iso-tetraketo-sterocholansäure.

0,3 g Tetraketo-sterocholansäure wurde in 20 ccm einer  $N/2$  Natronlauge gelöst, auf dem Wasserbade 2 Stunden lang erhitzt, die unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure abgeschiedene Fällung abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Fällung wurde aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Helle Tafeln vom Schmelzpunkt  $111-113^{\circ}$ . Ausbeute 0,2 g. Der Krystall zeigt eine positive Jaffesche Reaktion, eine kirschrote Farbe und entfärbt nicht die Bromlösung.

3,350 mg Subst.: 8,357 mg  $CO_2$ , 3,477 mg  $H_2O$ .

$C_{28}H_{40}O_6 \cdot H_2O$  Ber. C 68,53 H 8,63

Gef. „ 68,45 „ 8,68.

Spec. Drehung: 0,022 g Subst. in 5 ccm Aceton,  $l=1$  dm,

$\alpha = +0,08$   $[\alpha]_D^{28} = +18,18^{\circ}$

Diese Tetraketo-sterocholansäure ist aber weder durch Einwirkung der Salzsäure in Eisessig u. der Sodalösung noch durch die Einwirkung der Ameisensäure u. der Kameleonlösung in Aceton verändert worden.

### Methylester u. Oxim.

0,5 g Iso-tetraketo-sterocholansäure wurde in einer kleinen Menge von Methanol mit einer ätherischen Diazomethanolösung tropfenweise versetzt. Aus der Reaktionslösung wurde aber beim Einengen kein Krystall sondern ein Öl gewonnen. Dieses Öl wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat u. 0,2 g Natriumacetat in Alkohollösung versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt. Durch Einengen der Lösung wurde aber kein Krystall sondern ein Öl erhalten, welches aus keinen

organischen Lösungsmitteln krystallisierte.

### *III. Clemmensen'sche Reduktion der Tetraketo-sterocholansäure.*

0,3 g Tetraketo-sterocholansäure wurde in 50 cem Eisessig gelöst, 20 g amalgamiertes Zink zugesetzt und unter Kochen auf dem Sandbade weiterhin noch mit 50 cem konzentrierter Salzsäure und 50 cem Eisessig in drei Teilen jede Stunde versetzt. Das Kochen dauerte weiter 5 Stunden und zusammen 11 Stunden. Das auf der Reaktionsflüssigkeit schwimmende Öl wurde mit dem Glasstab gesammelt, in Wasser abermals digeriert, getrocknet und aus absolutem Alkohol umzukrystallisieren versucht, wobei aber kein Krystall gewonnen wurde. Die getrocknete Masse wurde also in 20 cem einer 10%igen Sodalösung aufgenommen, die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther geschüttelt, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und in Zimmertemperatur verdunsten gelassen. Hierbei wurde ebenfalls aus dem Rückstand kein Krystall gewonnen und beim Versuch des Umkrystallisierens des Rückstandes weder aus Aceton noch aus Essigester ein Krystall sondern immer ein Öl gewonnen.

### *IV. Katalytische Hydrierung der Tetraketo-sterocholansäure.*

0,3 g Tetraketo-sterocholansäure wurde in 15 cem absolutem Alkohol gelöst, die Lösung mit 0,5 g Platinoxid nach Adams, das in 5 cem absolutem Alkohol suspendiert und mit Wasserstoff gesättigt war, versetzt und unter Durchleitung von Wasserstoff reduziert, wobei nach 2 Stunden die Lösung 120 cem Wasserstoff verbraucht hatte. Das Reaktionsgemisch wurde vom Platinoxid abfiltriert, mit einer grossen Menge Wasser versetzt und die dabei abgeschiedene Fällung in Essigester aufgenommen, der Essigesterauszug mit Wasser gewaschen und getrocknet. Beim Einengen der Lösung wurde aber kein Krystall sondern eine ölige Masse gewonnen, die weder aus Methanol u. Aceton noch aus absolutem Alkohol krystallisierte.

V. *Triketo-sterocholansäurelaktone*.

Der aus dem Oxydationsprodukt des Trioxy-sterocholansäurelaktone gewonnene Chloroformextrakt wurde nach dem Waschen mit Wasser und Entwässerung von Chloroform abgedampft, der Rückstand im Exsikkator gut getrocknet und aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Feine federartig gruppierte Nadeln vom Schmelzpunkt 316°. Ausbeute 1,0 g. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine dunkelrote Farbe.

3,995, 3,530 mg Subst.: 10,615, 9,375 mg CO<sub>2</sub>, 3,145, 2,740 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> · ½ H<sub>2</sub>O

Ber. 72,21

H 8,88

Gef. 72,47, 72,42 „ 8,81, 8,68.

Dieses Laktone ist durch zweistündiges Erhitzen in N/2 Natronlauge unlösung unbeeinflusst geblieben.

*Trioxim.*

0,1 g Triketo-sterocholansäurelaktone wurde in 10 ccm Alkohol mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat u. 0,2 g Natriumacetat in Alkohol auf dem Wasserbade 3 Stunden erhitzt und die beim Einengen der Lösung abgeschiedene Fällung aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Zersetzungspunkt 266–267°.

3,350 mg Subst.: 0,326 ccm N (25°, 768 mm)

C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>

Ber. N 8,37 · Gef. N 8,50.

*Tetraketo-sterocholansäure aus Triketo-sterocholansäurelaktone*.

0,4 g Triketo-sterocholansäurelaktone wurde in 5 ccm Eisessig gelöst und mit 4 ccm einer 10%igen Chromsäureeisessiglösung 20 Minuten lang stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in eine grosse Menge von Wasser eingegossen und die dabei abgeschiedene Fällung nach dem Waschen mit Wasser aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 214–215°. Ausbeute 0,15 g. Keine Schmelzpunktdepression mit der durch Oxydation mit Chromsäure aus Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt 208° gewonnenen.

*Triketo-monoxy-sterocholansäure*.

0,2 g Triketo-sterocholansäurelaktone wurde in 10 ccm einer N/2 Natronlauge unter Erwärmen gelöst und die durch Ansäuern mit

verdünnter Essigsäure abgeschiedene Fällung nach dem Waschen mit Wasser aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt 307–308°. Ausbeute 0,1 g.

2,890, 3,315 mg Subst.: 7,400, 8,475 mg CO<sub>2</sub>, 2,290, 2,600 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub> ·  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O

Ber. C 69,52

H 8,96

Gef. „ 69,83, 69,72 „ 8,87, 8,78.

*Triketo-sterocholansäurelaktone aus Triketo-monoxy-sterocholansäure.*

0,1 g Triketo-monoxy-sterocholansäure wurde in 3 ccm reiner Ameisensäure auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erwärmt und die durch Eingiessen der Reaktionslösung in Wasser abgeschiedene Fällung aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Federartig gruppierte feine Nadeln vom Schmelzpunkt 316°. Keine Schmelzpunktdepression mit der durch Oxydation mit Chromsäure aus Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt 208° gewonnenen.

*Triketo-monoxy-sterocholansäuremethylester.*

0,2 g Triketo-monoxy-sterocholansäure wurde in Methanol üblicherweise mit ätherischer Diazomethanlösung verestert. Der aus Methanol-Wasser umkrystallisierte Nadelkrystall schmilzt bei 226–227°.

3,105, 2,655 mg Subst.: 7,950, 6,810 mg CO<sub>2</sub>, 2,415, 2,070 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub> ·  $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O

Ber. C 69,97

H 8,91

Gef. „ 69,83, 69,95 „ 8,70, 8,72.

*Tetraketo-sterocholansäuremethylester.*

0,2 g Triketo-monoxy-sterocholansäuremethylester wurde in 2 ccm Eisessig gelöst, mit 2 ccm einer 10% igen Chromsäureeisessiglösung tropfenweise versetzt und weiter 20 Minuten lang stehen gelassen. Die dabei durch Eingiessen der Reaktionslösung in Wasser abgeschiedene Fällung wurde aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 151–152°. Ausbeute 0,08 g. Keine Schmelzpunktdepression mit dem durch Oxydation mit Chromsäure aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 156–157° gewonnenen, und mit dem durch Ver-

esterung der Tetraketo-sterocholansäure vom Schmelzpunkt 214–215° mit Diazomethan erhaltenen Ester.

3,495 mg Subst.: 9,131 mg CO<sub>2</sub>, 2,730 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub> Ber. C 71,56 H 8,70

Gef. „ 71,25 „ 8,74.

#### VI. Clemmensensche Reduktion des Triketosterocholansäurelaktons.

0,3 g Lakton wurde in 50 ccm Eisessig gelöst, 20 g amalgamiertes Zink zugesetzt (2 g Zn in 30 ccm einer Sublimatlös. 30 Minuten) und unter Kochen auf dem Sandbad weiterhin noch mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure und 50 ccm Eisessig in drei Teilen alle 3 Stunden versetzt. Das Kochen dauerte weiter 5 Stunden und das Reaktionsgemisch wurde eine Nacht stehen gelassen. Das auf der Flüssigkeit schwimmende Öl wurde mit dem Glasstab abgehoben, in Wasser digeriert, in Äther aufgenommen und der Ätherauszug mit einer 10%igen Sodalösung ausgeschüttelt. Die Sodalösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die dabei abgeschiedene ölige Masse in Essigester aufgenommen und der Essigesterextrakt nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen eingengt. Dabei wurde keine krystallinische Masse sondern ein Öl erhalten.

Der obenerhaltene Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche abgedampft und der Rückstand in 20 ccm einer N/2 Natronlauge erwärmend gelöst. Die Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure ausgefällt und das dabei abgeschiedene Öl lieferte aber aus Essigester und Aceton keinen Krystall.

#### VII. Katalytische Hydrierung des Triketosterocholansäurelaktons.

0,3 g Triketolakton vom Schmelzpunkt 316° wurde in 15 ccm Eisessig mit 0,1 g Platinoxid und Wasserstoff katalytisch hydriert. Dabei nahm die Lösung innerhalb von 4 Stunden 5 Mole Wasserstoff auf. Die Reaktionslösung wurde von Platinoxid abfiltriert und in eine grosse Menge Wasser eingegossen. Die dabei ab-

geschiedene Fällung wurde abgesaugt, gut getrocknet und aus Aceton, Essigester und Alkohol umzukrystallisieren versucht, wobei die Substanz aber nicht krystallisierte.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. T. Kazuno für seine freundlichen Leitung und Unterstützung bei meiner Arbeit und der japanischen Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen und industriellen Forschungen für die zur Verfügung gestellten Mitteln meinen herzlichen Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Shimizu, T. u. Oda, T. (1934): Z. Physiol. Chem., **227**, 74.  
Windaus, A. u. Bohne, A. (1923): Ann. d. Chem., **433**, 278.  
Wieland, H., Schlichting, O. u. Jacobi, R. (1926): Z. Physiol. Chem., **161**, 91.  
Yamasaki, K. u. Yuuki, M. (1936): Z. Physiol. Chem., **244**, 173.



## ÜBER DIE ALLIGATORSCHILDKRÖTENGALLE (IV).

### Über den Abbau des Trioxy-sterocholansäurelaktons bis zur Bisnor-cholsäure, 3.7.12-Trioxypregnan-20-on und 3.7.12-Trioxäthiocholansäure.

VON

TUTOMU KANEMITU.

(Aus dem Biochemischen Institut Med. Fakultät Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1941)

Es wurde bereits in voriger Mitteilung erwähnt, dass das von Yamasaki u. Yuuki (1936) aus der Galle von Alligatorschildkröten isolierte Laktone im Kern des Moleküls drei und in der Seitenkette eine sekundäre Alkoholgruppe hat und dass es ein  $\gamma$ -Laktone ist, welches durch Alkali in eine Tetraoxysäure aufgespalten wird, obwohl diese wieder durch die Wirkung von Säure wie Ameisensäure oder durch ein Oxydationsmittel leicht in ursprüngliches Laktone zurückverwandelt wird.

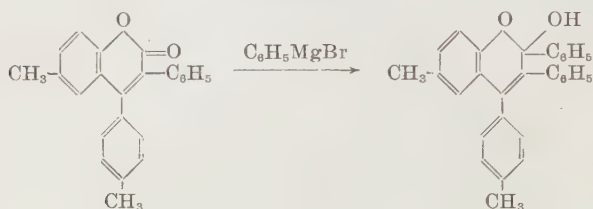
Um die Stellung der sekundären Alkoholgruppen und die Art des Laktone festzustellen, wurde im vorliegenden Versuch der Abbau der Seitenkette nach Shimizu u. Kazuno (1936) ausgeführt.

Tetraoxy-sterocholansäuremethylester oder Trioxy-sterocholansäurelaktone (I) wurde mit Grignardschem Reagens in Carbinol verwandelt, wobei krystallinisches Monomethylcarbinol (II) vom Schmelzpunkt 195° und ein öliges Dimethylcarbinol (III) in beiden Fällen je in gleicher Menge erhalten wurde. Dies zeigt, dass bei der Bildung des Carbinols mittelst Grignardschem Reagens aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester erst unter Ringschluss das Trioxylaktone, dann das Carbinol gebildet wird.

Das Monomethylcarbinol (II) liefert bei der Oxydation mit Chromsäure in Zimmertemperatur ein nicht krystallisierbares Triketocarbinol, welches ein Trioxim vom Schmelzpunkt 229–231°

ergibt, was dadurch unterstützt wird, dass 3-Phenyl-4-P-tolyl-6-methyl-cumarin mit Grignardschem Reagens in Phenylcarbinol verwandelt wird, wie aus der folgenden Figur 1 ersichtlich ist, und dass aus Dihydrocumarin durch Einwirkung des Phenylmagnesiumbromides ein Diphenylcarbinol gebildet wird.

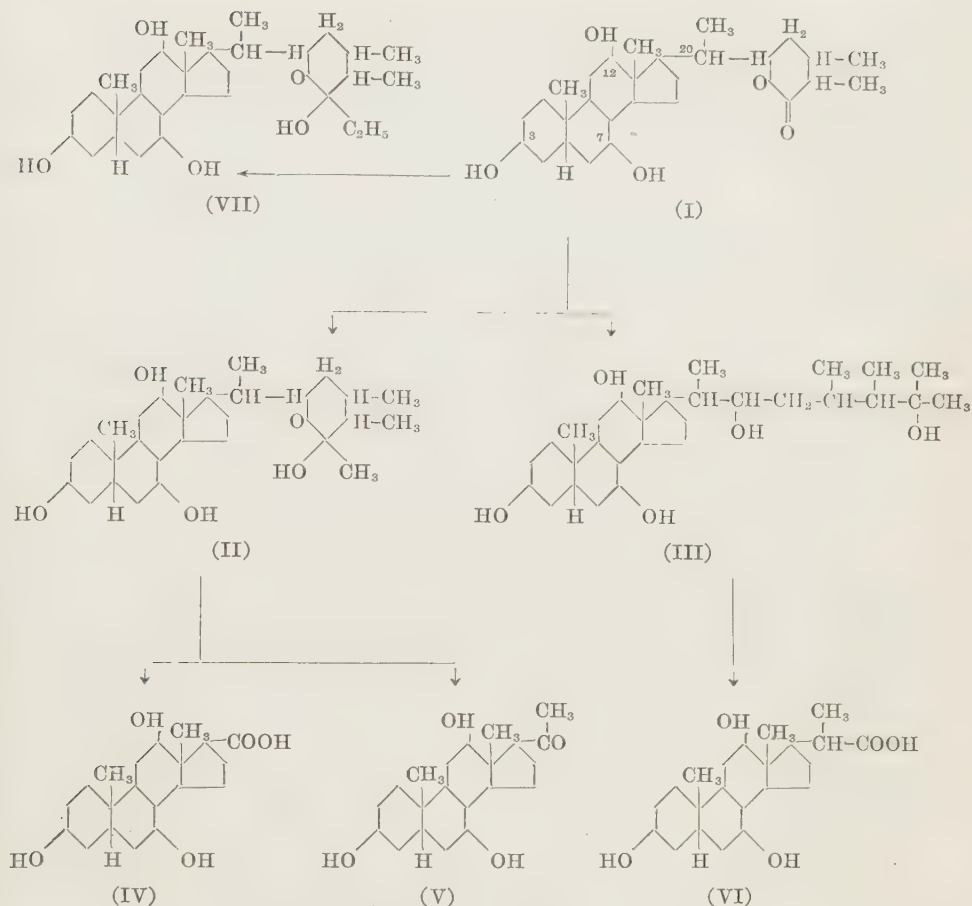
Fig. 1.



Andrerseits wird das durch Oxydation aus Acetyl-tigogenin gewonnene Lakton (Tschesche u. Hagedorn 1935) mit Grignardschem Reagens unter Ringspaltung in ein tertiäres Diphenylcarbinol verwandelt, aus welchem unter Wasserspaltung ein Furanderivat gebildet wird, was zeigt, dass es sich um ein  $\gamma$ -Lakton handelt, während bei der Wirkung des Grignardschen Reagens auf Trioxy-sterocholansäurelakton ohne Ringspaltung Monomethylcarbinol gebildet wird, was bedeutet, dass es sich um ein  $\delta$ -Lakton handelt.

Das Monomethylcarbinol wurde nach Wieland u. Kapitel (1932) acetyliert. Dabei wurde ein öliges Triacetat gewonnen, aus welchem durch Oxydation mit Chromsäure ebenfalls ein öliges 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure-triacetat, dann durch Hydrolyse 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure (IV)  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$  vom Schmelzpunkt  $171^\circ$  erhalten wurde, welche sich mit der von Shimizu u. Kazuno (1936. Siehe s. 190) durch systematischen Abbau der Cholsäure mit Grignardschem Reagens gewonnenen 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure, Äthiocholsäure vom Schmelzpunkt  $171^\circ$  ganz identisch erwies; ihr in Nadeln krystallisierter Methylester schmolz bei  $184^\circ$ .

Bei der Oxydation von Monomethylcarbinol-triacetat mit Chromsäure wurde als neutrales Produkt ein Ketontriacetat gewonnen, aus welchem durch Hydrolyse ein 3.7.12-Trioxy-pregnan-(20)-

3.7.12-Trioxo-  
äthiocholansäure

3.7.12-Trioxo-pregnan-(20)-on

Bisnorcholsäure

on (V)  $C_{21}H_{34}O_4$  vom Schmelzpunkt  $210-211^\circ$  gewonnen wurde.

Dieses Keton gibt ein Monoxim vom Schmelzpunkt  $249^\circ$  und bei der Oxydation mit Chromsäure ein 3.7.12-Triketo-pregnan-(20)-on  $C_{21}H_{28}O_4$  vom Schmelzpunkt  $185-187^\circ$ .

Dieses 3.7.12-Trioxo-pregnan-(20)-on und die 3.7.12-Trioxo-äthiocholansäure zeigen eine positive Hammarstensehe Reaktion.

Aus dem von Monomethylcarbinol befreiten Filtrat wurde ein

anderes Carbinol erhalten, welches als ein Dimethylcarbinol (III) betrachtet werden konnte. Dieses Carbinol (III) wurde nach Acetylierung der Oxydation mit Chromsäure unterworfen, aus dessen Oxydationsprodukte durch Hydrolyse eine Trioxysäure (VI)  $C_{22}H_{36}O_5$  vom Schmelzpunkt  $290^\circ$  gewonnen wurde. Diese Säure (VI) erwies sich mit der von Shimizu u. Kazuno (1936) durch systematischen Abbau der Cholsäure nach Grignard erhaltenen Bisnor-cholsäure vom Schmelzpunkt  $290^\circ$  als ganz identisch.

Als Abbauprodukte des Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt  $208^\circ$  wurden die wohlbekannte Bisnor-cholsäure  $C_{22}H_{36}O_5$  und Äthiocholsäure  $C_{20}H_{32}O_5$  erhalten, was zeigt, dass das Trioxy-sterocholansäurelaktone  $C_{28}H_{46}O_5$  ein  $\delta$ -Laktone ist und dass sich die drei sekundären Alkoholgruppen in der Stellung an  $C_3$ ,  $C_7$  und  $C_{12}$  im Kern des Laktone befinden müssen.

Das Laktone ist also eine  $\delta$ -Form, stammt aus 3.7.12.22-Tetraoxysterocholansäure von der Formel  $C_{28}H_{48}O_6$  und enthält ein Cholsäureskelett im Molekül des Laktone.

Andererseits wurde durch Einwirkung von Äthylbromid nach Grignard Monoäthylcarbinol (VII) vom Schmelzpunkt  $192^\circ$  sowohl aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester als auch aus Trioxy-sterocholansäurelaktone erhalten.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

### I. Abbau des Trioxy-sterocholansäurelaktone nach Grignard.

#### 1) Monomethylcarbinol.

Eine wasserfreie Benzollösung von Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt  $208^\circ$  (1,5 g Laktone in 100 ccm Benzol) wurde zu der Grignardlösung (0,6 g Magnesium und 7 g Jodmethyl in 50 ccm wasserfreiem Äther) allmählich tropfenweise zugesetzt. Diese Lösung wurde auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt, möglichst von Lösungsmitteln befreit und mit Eiswasser und verdünnter Schwefelsäurelösung zersetzt. Die dabei erhaltene Fällung wurde in Essigester aufgenommen, mit verdünnter

Natriumbisulfitlösung gut gewaschen, um das Jod zu reduzieren, dann der Essigsterauszug mit Wasser gut gewaschen, getrocknet und mit 100 ccm einer 5% igen alkoholischen Kalilauge 2 Stunden lang erwärmt. Das Hydrolysat wurde in viel Wasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert und mit Wasser gut gewaschen.

Die Fällung wurde in Essigester gelöst, mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Die dabei abgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt und aus Essigester umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 195°. Ausbeute 0,6 g. Der Krystall ist gegen Brom gesättigt, in Natronlauge unlöslich und in Methanol leicht löslich. Er zeigt eine positive Hammarstensehe Reaktion.

4,255 mg Subst.: 11,160 mg CO<sub>2</sub>, 3,970 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>½H<sub>2</sub>O.

Ber. C 71,39 H 10,54

Gef. „ 71,53 „ 10,44.

Aus dem von Monomethylcarbinol befreiten Essigsterauszug schieden sich beim Einengen nicht mehr Krystalle sondern Öle ab, die aus allen möglichen Lösungsmitteln nicht krystallisierten und als Dimethylcarbinol betrachtet werden müssen.

Das von Monomethylcarbinol abfiltrierte alkalische Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Essigester gelöst, mit einer 10% igen Sodalösung ausgeschüttelt und in eine Essigesterfraktion und eine Sodalösungsfraktion getrennt.

Aus diesem Essigsterauszug wurden nach dem Waschen mit Wasser, Trocknen mit Pottasche durch Einengen Krystalle gewonnen. Diese wurde aus Essigester umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 195°. Ausbeute 0,05 g. Keine Schmelzpunktdepression mit dem obenbeschriebenen Monomethylcarbinol. Aus der Sodalösungsfraktion wurden leider keine Krystalle erhalten.

#### *Tri keto-monomethyl-carbinol.*

0,2 g Monomethylcarbinol vom Schmelzpunkt 195° wurde in 5 ccm Eisessig gelöst, mit 2 ccm einer 10% igen Chromsäureeisessiglösung versetzt und 20 Minuten lang stehen gelassen. Das Gemisch

wurde in viel Wasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche im Zimmer verdunsten gelassen, wobei ein öliger Rückstand zurückblieb der nicht krystallinisch wurde.

*Triketo-monomethylcarbinol-trioxim.*

Das obenerhaltene ölige Triketo-monomethylcarbinol wurde nach dem Trocknen im Exsikkator in 10 ccm Alkohol gelöst, mit einer alkoholischen Lösung von 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,2 g Natriumacetat versetzt, auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erhitzt, die beim Einengen der Lösung abgeschiedenen Krystalle abgesaugt und aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Blättchen vom Schmelzpunkt 229–231°.

2,810 mg Subst.: 0,192 ccm N (12°, 770 mm).

$C_{20}H_{47}O_6N_3$  Ber. N 8,12 Gef. N 8,30.

*Monomethylcarbinol-triacetat.*

4,2 g Monomethylcarbinol vom Schmelzpunkt 195° wurden in 60 ccm Pyridin gelöst und unter Zusatz von 40 ccm Essigsäureanhydrid 19 Stunden lang erhitzt. Das Gemisch wurde in viel Eiswasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abgesaugt, mit Wasser gewaschen, in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit einer 5% igen Salzsäurelösung ausgeschüttelt und der Ätherauszug mit Wasser gut gewaschen. Der beim Verdunsten der Ätherlösung zurückgebliebene ölige Rückstand wurde aus allen möglichen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht, blieb aber immer ein Öl.

2) *3.7.12-Trioxo-aethiocholansäure aus Monomethylcarbinol.*

Das ölige aus 4,2 g Monomethylcarbinol bereitete Monomethylcarbinoltriacetat wurde nach dem Trocknen in 42 ccm Eisessig gelöst, mit 84 ccm einer 5%igen Chromsäureeisessiglösung auf dem erwärmenden Wasserbade tropfenweise innerhalb 50 Minuten versetzt und weitere 10 Minuten stehen gelassen.

Das Gemisch wurde in viel Eiswasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert, in Äther aufgenommen, der Äther-



auszug mit einer 5%igen Sodalösung ausgeschüttelt und in eine Äther- und Sodalösungsfraction getrennt.

Die Sodalösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei entstandene milchige Trübung durch Zusatz von Kochsalz ausgesalzen, die dabei auf der Flüssigkeit schwimmende knetbare Substanz in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und abdestilliert.

Der Rückstand wurde in 50 ccm einer 5%igen Kalilauge gelöst, auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erwärmt, unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die dabei abgeschiedene Fällung in Essigester aufgenommen und der Essigesterauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen mit Pottasche abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Aceton umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt  $171^{\circ}$ . Ausbeute 0,2 g. Der Krystall zeigt eine positive Hammarstense Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion erst eine orangerote dann kirschrote Farbe. Keine Schmelzpunktdepression mit einer von Shimizu und Kazuno (1936) durch systematischen Abbau nach Grignard aus Cholsäure hergestellten 3.7.12-Trioxo-äthiocholansäure.

3,270 mg Subst.: 7,975 mg  $\text{CO}_2$ , 2,725 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  Ber. C 66,44 H 9,20

Gef. „ 66,51 „ 9,33.

#### *Methylester.*

0,05 g 3.7.12-Trioxo-äthiocholansäure wurden in Methanol mittelst ätherischer Diazomethanolösung in üblicher Weise verestert und der beim Einengen der Ätherlösung abgeschiedene Krystall wurde aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt  $184^{\circ}$ .

3,545 mg Subst.: 8,700 mg  $\text{CO}_2$ , 3,025 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_5\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  Ber. C 67,17 H 9,40

Gef. „ 66,93 „ 9,55.

#### 3) 3.7.12-Trioxo-pregnan-(20)-on aus Monomethylcarbinol.

Der von der 3.7.12-Trioxo-äthiocholansäure enthaltenden Sodalösung getrennte Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche abdestilliert. Der Rückstand wurde

in 100 ccm einer 5%igen alkoholischen KalilaugeLösung auf dem Wasserbade 2 Stunden erwärmt, nach dem Abdampfen des Alkohols mit viel Wasser versetzt, die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde aus Aceton umkrystallisiert. Prismen vom Schmelzpunkt 210–211°. Ausbeute 0,7 g.

Der Krystall zeigt eine positive Hammarstensehe Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion erst eine violettrote, dann kirschrote Farbe.

3,825 mg Subst.: 9,860 mg CO<sub>2</sub>, 3,332 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>½H<sub>2</sub>O.

Ber. C 70,15 H 9,82

Gef. „ 70,30 „ 9,75.

#### *Monoxim.*

0,1 g 3.7.12-Trioxo-pregnan-(20)-on wurde in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,1 g Hydroxylaminchlorhydrat und 0,2 g Natriumacetat als alkoholische Lösung versetzt und auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt.

Der beim Einengen der Lösung abgeschiedene Krystall wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Schuppen vom Zersetzungspunkt 249°.

4,085 mg Subst.: 0,113 ccm N (16°, 763 mm)

C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>N

Ber. N 3,83

Gef. N 3,28.

#### *3.7.12-Triketo-pregnan-(20)-on.*

0,2 g Trioxo-pregnan-(20)-on vom Schmelzpunkt 210–211° wurde in 50 ccm Eisessig gelöst, mit 5 ccm einer 5%igen Chromsäureeisessiglösung vorsichtig tropfenweise versetzt, 20 Minuten lang stehen gelassen und mit viel Wasser versetzt. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Methanol-Wasser umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 185–187°. Asbeute 0,04 g.

3,215 mg Subst.: 8,644 mg CO<sub>2</sub>, 2,360 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>

Ber. C 73,21 H 8,19

Gef. „ 73,33 „ 8,21.

#### 4) *Bisnor-cholsäure aus Dimethylcarbinol.*

Aus dem vom Monomethylcarbinol befreiten Filtrat wurden

6 g einer öligen Masse erhalten, wie im ersten Kapitel erwähnt wurde. Diese Masse wurde in 50 ccm Pyridin gelöst, mit 30 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und auf dem Wasserbade 19 Stunden erwärmt. Das Gemisch wurde in viel Eiswasser gegossen, die dabei abgeschiedene weisse Fällung abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Äther aufgenommen. Der Ätherauszug wurde mit einer 5%igen Salzsäurelösung gewaschen, wieder mit Wasser gewaschen, getrocknet und die beim Einengen abgeschiedene ölige Masse aus allen möglichen Lösungsmitteln umzukristallisieren versucht, wobei aber kein Krystall erhalten wurde.

Diese als Dimethylcarbinol-tetracetat zu betrachtende ölige Masse wurde nach dem völligen Trocknen in 50 ccm Eisessig gelöst, auf dem erwärmenden Wasserbade mit 120 ccm einer 5%igen Chromsäureeisessiglösung (6 g  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  in 120 ccm Eisessig) innerhalb 80 Minuten tropfenweise versetzt und weitere 10 Minuten stehen gelassen. Das Gemisch wurde in viel Wasser gegossen, die dabei abgeschiedene Fällung abfiltriert und in Äther aufgenommen.

Der Ätherauszug wurde durch Schüttelung mit einer 5%igen Sodalösung in je eine Sodalösungs- und Ätherfraktion getrennt.

Die Sodalösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die dabei aus der Flüssigkeit abgeschiedene knetbare Substanz in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und der Äther abdestilliert.

Der Rückstand wurde in 50 ccm einer 5%igen Kalilauge gelöst, auf dem Wasserbade 2 Stunden erwärmt und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde in Essigester gelöst und die Lösung nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche eingeengt.

Die dabei abgeschiedenen Krystalle wurden aus Essigester umkristallisiert. Hexaeder vom Schmelzpunkt  $290^\circ$ . Ausbeute 0,2 g. Der Krystall zeigt eine positive Hammarstensehe Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion eine orangerote Farbe.

Keine Schmelzpunktdepression mit der von Shimizu u. Kazuno (1936) durch stufenweisen Abbau der Cholsäure nach Grignard hergestellten Bisnor-cholsäure vom Schmelzpunkt  $290^\circ$ .

3,150 mg Subst.: 8,030 mg CO<sub>2</sub>, 2,655 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>

Ber. C 69,43 H 9,54

Gef. „ 69,52 „ 9,43.

### *Äthylester.*

0,1 g Bisnor-cholsäure vom Schmelzpunkt 290° wurden in absolutem Alkohol gelöst, unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbade 3 Stunden erwärmt, das Gemisch in viel Wasser gegossen, die beim Einengen abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen mit Pottasche der Äther abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Die Substanz sintert bei 100° und schmilzt bei 150°. Keine Schmelzpunktdepression mit reinem aus Cholsäure hergestelltem Bisnor-cholsäureäthylester.

4,080 mg Subst.: 10,551 mg CO<sub>2</sub>, 3,560 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>

Ber. C 70,53 H 9,87

Gef. „ 70,40 „ 9,76.

Die vom in Sodalösung löslichen Säureanteil befreite Ätherfraktion wurde nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen mit Pottasche vom Äther befreit, der Rückstand in 100 ccm einer 5%igen alkoholischen Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade 2 Stunden lang erhitzt. Das Hydrolysat wurde in viel Wasser eingegossen, die beim Abdestillieren des Alkohols abgeschiedene Fällung abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und in Essigester gelöst. Die beim Einengen der Lösung abgeschiedene Masse wurde aus allen Lösungsmitteln umzukrystallisieren versucht, blieb jedoch immer ein Öl.

### *II. Monoethylcarbinol aus Tetraoxy-sterocholansäuremethylester und Trioxy-sterocholansäurelaktone.*

Der Grignardlösung (0,6 g Magnesium und 7 g Äthylbromid in 50 ccm wasserfreiem Äther) wurde die Äther-Benzollösung (1:1) von Tetraoxy-sterocholansäuremethylester vom Schmelzpunkt 156–157° (1 g Ester in je 25 ccm Äther u. Benzol) allmählich tropfenweise zugesetzt. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade

5 Stunden lang erhitzt, von den Lösungsmitteln befreit, dann im Exsikkator getrocknet und mit Eiswasser und 2*N*-Schwefelsäurelösung zersetzt.

Die dabei abgeschiedene Fällung wurde abgesaugt, mit Essigester extrahiert, der Essigesterauszug mit verdünnter Natriumbisulfitlösung gut gewaschen, um das Brom zu reduzieren, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet und die Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde nach dem Trocknen mit 100 cem einer 5%igen alkoholischen KalilaugeLösung auf dem Wasserbade 8 Stunden lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in viel Wasser gegossen, auf dem Wasserbade der Alkohol abdestilliert, die dabei erhaltene Fällung in Essigester aufgenommen und in zwei Fraktionen—eine Essigesterfraktion und eine alkalische Lösungsfraktion—getrennt.

Die Essigesterfraktion wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche eingeengt und die dabei abgeschiedene Masse aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismatischer Krystall sintert bei 130° und schmilzt dann bei 192°. Ausbeute 0,03 g.

Bei Liebermannscher Reaktion zeigt der Krystall eine kirschrote Farbe. Keine Schmelzpunktdepression mit dem durch Einwirkung von Äthylmagnesiumbromid aus Trioxy-sterocholansäurelaktone gewonnenen Carbinol.

3,195 mg Subst.: 8,230 mg CO<sub>2</sub>, 2,996 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub>·H<sub>2</sub>O                      Ber. C 70,53    H 10,66

Gef.    „ 70,25    „ 10,53.

Dieses oben erwähnte Monomethylcarbinol wurde ebenfalls in genau gleicher Weise aus Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt 208° gewonnen.

Die andere alkalische Lösungsfraktion wurde auf dem Wasserbade von Essigester befreit, unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Essigester aufgenommen und der Essigesterauszug mit einer 10%igen Sodalösung ausgeschüttelt. Hierbei wurden eine Sodalösungsfraktion und eine Essigesterfraktion erhalten.

Die Sodalösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter



Essigsäure ausgefällt, die Fällung in Essigester aufgenommen, der Essigesterauszug mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeeengt, wobei aber kein Krystall sondern immer ein Öl gewonnen wurde. Aus der Essigesterfraktion wurden nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche durch Einengen Krystalle gewonnen, die aus Essigester umkrystallisiert wurden. Tafeln vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$ . Ausbeute 0,05 g. Keine Schmelzpunktdepression mit dem Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$ .

*Anhang: Von T. Shimizu u. T. Kazuno. 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure (Äthio-cholsäure) aus Bisnor-cholsäure.*

Die durch stufenweisen Abbau nach Grignard aus Cholsäure hergestellte Bisnor-cholsäure wurde mit Diazomethan verestert, acetyliert und diese Methyl-ester-triacetate von 3 g in Äther-Benzolgemisch (1:1) unter Zusatz einer berechneten Menge von Methylmagnesiumjodid auf dem Wasserbade 5 Stunden lang erhitzt. Das Gemisch wurde in üblicher Weise mit Eis und Schwefelsäure zerlegt und mit alkoholischem Kali hydrolysiert. Das hierbei erhaltene Carbinol von 2,5 g wurde in üblicher Weise acetyliert, dieses Acetat von ca. 2,5 g in 25 ccm Eisessig gelöst, mit 25 ccm einer 10%igen Chromsäureeisessiglösung auf dem Wasserbade bei  $90^{\circ}$  20 Minuten lang erwärmt. Das Gemisch wurde in viel Wasser gegossen, die hierbei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Abdampfen des Äthers mit einer 10%igen Kalilauge gelöst 2 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung aus Methanol oder Aceton umkrystallisiert.

Der Prismatische Krystall schmilzt unter Schäumen bei  $171^{\circ}$ . Ausbeute 0,25 g. Die Säure zeigt eine positive Hammarstensche Reaktion und bei Liebermannscher Reaktion erst eine orangerote, dann kirschrote Farbe. Diese Säure zeigt mit der aus Trioxy-sterocholansäurelaktone vom Schmelzpunkt  $208^{\circ}$  hergestellten 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

3,335 mg Subst.: 8,301 mg  $\text{CO}_2$ , 2,630 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$

Ber. C 68,14 H 9,15

Gef. „ 67,89 „ 9,06.



Zum Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. T. Kazuno für seine freundlichen Leitung und Unterstützung bei meiner Arbeit und der japanischen Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen und industriellen Forschungen für die zur Verfügung gestellten Mitteln meinen herzlichen Dank auszusprechen.

## LITERATUR.

- Shimizu, T. u. Kazuno, T. (1936): Z. Physiol. Chem., **244**, 167.  
Shriner, R. L. u. Moffett, R. B. (1941): JI. of Amer. Chem. Soc.,  
**63**, 1694.  
Smith, L. I. u. Reeoff, P. M. (1940): JI. of Amer. Chem. Soc., **62**, 145.  
Tschesche, R. u. Hagedorn, A. (1935): Ber. d. deutsch. Chem. Ges.,  
**68**, 1417.  
Wieland, H. u. Kapitel, W. (1941): Z. Physiol. Chem., **212**, 271.  
Yamasaki, K. u. Yuuki, M. (1936): Z. Physiol. Chem., **244**, 173.



## ÜBER RACEMISCHE ISOMERE DES LEUCYL-ISOSERINS.

VON

YOSHINORI SEIKI.

*(Aus der pharmazeutischen Abteilung der medizinischen Fakultät  
zu Nagasaki.)*

(Eingegangen am 25. Dezember 1941)

Bei der asymmetrischen Synthese der  $\gamma$ -Amino- $\beta$ -oxy-Buttersäure, die nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom hat, haben M. Tomita und sein Mitarbeiter (1927) festgestellt, dass diese Aminosäure in festem Zustand in vier optisch-aktive Formen und zwar zwei Paare von Antipoden gespalten wird. Später haben sie (1932) auch bei der optischen Spaltung des Benzoyl-isoserins ausser den normalen Antipoden noch ein anderes Antipoden-Paar dargestellt.

Diese besondere Isomerisation, die von der klassischen Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms nicht ohne weiteres erklärt werden kann, konnte ich in Gemeinsamkeit mit Herrn Prof. M. Tomita (1939) durch eine Debye-Scherrer'sche röntgenographische Untersuchung klarer auffassen. Wir haben die Brauchbarkeit dieser Methode seitdem näher untersucht und durch Anwendung der Röntgenographie gelang es uns (1941) das Glykokoll, welches kein asymmetrisches Kohlenstoffatom hat, in zwei Formen einmal die offene Formel einer Aminoessigsäure und dann die betainartige Ringformel eines inneren Salzes zu isolieren.

Da nun der Gedanke naheliegt, dass diese überzählige Isomerisation nicht durch eine von den asymmetrischen Kohlenstoffatomen festgesetzten Stereoisomerie, sondern durch eine Carboxy-cyclo-Desmotropie unter Valenzwechsel des Stickstoffes bedingt ist, so haben wir diese Erfahrungen den Feststellungen angefügt, die E. Fischer und F. Kölker (1905) bei dem Leucyl-isoserin gemacht haben und die besagen, dass die Bildung von zwei stereoisomeren Racemkörpern dabei möglich ist. Röntgenographi-

sche Untersuchung der beiden racemischen isomeren Leucyl-isoserine liefert ein weiteres Beispiel der Carboxy-cyclo-Desmotropie.

#### EXPERIMENTELLE BELEGE.

##### I. *$\alpha$ -Brom-isocapronyl-isoserin.*

Zur Darstellung von  *$\alpha$ -Brom-isocapronyl-isoserin* habe ich nach der Verschrift von E. Fischer und F. Kölker (1905) 6 g Isoserin in 57,5 ccm *n*-Natronlauge gelöst und unter Kühlung mit einer Eiskochsalzmischung in kleinen Portionen abwechselnd mit 14,6 g  *$\alpha$ -Brom-isocapronylchlorid* und 86,5 ccm *n*-Natronlauge versetzt und jedesmal geschüttelt, bis der Geruch nach Säurechlorid verschwunden ist. Die alkalische Lösung wird dann durch 17,4 ccm fünffach *n*-Salzsäure angesäuert und der teilweise ausfallende ölige Bromkörper wiederholt ausgeäthert. Beim Verdampfen des Äthers bleibt ein Öl, das bald zum grössten Teile krystallisiert. Durch Anrühren mit Petroläther wird die beigemengte Bromcapronsäure beseitigt. Die Ausbeute der krystallinischen Substanz betrug 9 g. Man bekam noch 7 g des öligen Bromkörpers.

Zur röntgenographischen Untersuchung wurde die krystallinische Substanz mehrmals aus der fünffachen Menge heissem Wasser umkrystallisiert, wobei der Schmelzpunkt 130 bis 135° konstant blieb. Ausbeute 6,5 g. Aus der Mutterlauge wurde nach dem Einengen 2,5 g erhalten.

Die röntgenographischen Untersuchungen wurden nach der Pulvermethode ausgeführt. Es wurde eine mit Nickelfilter gefilterte Cu-Strahlung benutzt. Fig. 1. zeigt die Diagramme der Röntgenographie des zuerst auskrystallisierten  *$\alpha$ -Brom-isocapronyl-isoserins*. Der zuletzt erhaltene Bromkörper gibt die Fig. 2.

Wie man aus Fig. 1. ersieht, ist die Diagramme der Röntgeno-

Fig. 1.

*$\alpha$ -Brom-isocapronyl-isoserin.*

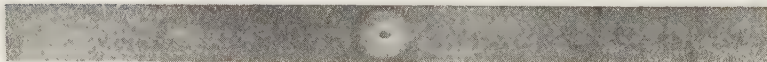


Fig. 2.

 $\alpha$ -Brom-isocapronyl-isoserin.

graphie sehr unscharf. Das Präparat ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein Gemisch, da es bei der Behandlung mit Ammoniak zwei Dipeptide liefert.

## II. *Leucyl-isoserin.*

Löst man den zuerst auskrystallisierten Bromkörper (6,5 g) in der fünffachen Menge wässrigen Ammoniaks von 25% und lässt ihn drei bis vier Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen, so ist die Abspaltung des Broms nahezu vollständig. Zur Isolierung des Dipeptides wird die ammoniakalische Lösung auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol verdampft, dann nochmals in Wasser gelöst und zur möglichst vollständigen Entfernung des freien Ammoniaks wieder verdampft. Zur Beseitigung des Bromammons löst man dann in wenig heissem Wasser und fällt mit dem vielfachen Volumen absoluten Alkohols. Das halogenfreie Rohprodukt wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert. Die schwerer lösliche Form schied sich zuerst aus (2,4 g). Sie zersetzt sich gegen 228° unter Anschäumen. Diese Substanz wurde als *Leucyl-isoserin A* bezeichnet. Fig. 3. zeigt die Diagramme der Röntgenographie des *Leucyl-isoserins A*.

Fig. 3.

*Leucyl-isoserin A.*

Nach der vollständigen Auskrystallisation der schwerer löslichen Form des Dipeptides wurde die Mutterlauge eingengt und im Eisschrank stehen gelassen. Es scheidet sich dabei in farblosen Nadeln aus. Man bezeichnet diese Substanz als *Leucyl-isoserin B*. In bezug auf Schmelzpunkt, Geschmack, Verhalten gegen Phosphorwolframsäure ist die Verbindung gleich dem

Leucyl-isoserin A. Fig. 4. zeigt die Diagramme der Röntgenographie des Leucyl-isoserins B.

Fig. 4.

Leucyl-isoserin B.



Fig. 5.

Obere Hälfte: Leucyl-isoserin A.

Untere Hälfte: Leucyl-isoserin B.



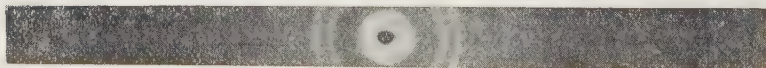
Wie man aus Fig. 3., 4. und 5. ersieht, sind die Diagramme von Leucyl-isoserin A und B ganz verschieden. Es unterliegt also keinem Zweifel, dass die beiden Dipeptide verschiedene Struktur haben.

### *III. Das aus öligem Gromkörper dargestellte Leucyl-isoserin.*

Die Verwandlung des öligen Bromkörpers in das Dipeptid verläuft glatt. Aber die Ausbeute betrug 50% der Theorie, während das aus krystallinem Bromkörper verwandte Leucyl-isoserin mit 80% Ausbeute entsteht. Darstellung und Reinigung des Dipeptides sind die gleichen, wie bei dem krystallinen Bromkörper. An der ausgeschiedenen Verbindung wurde durch röntgenographische Untersuchung festgestellt, dass sie ein einheitlicher Körper ist. Fig. 6. weist ihre Diagramme auf. Sie ist identisch mit der Diagramme von Fig. 4., so dass die Substanz als Leucyl-isoserin B angenommen wird.

Fig. 6.

Leucyl-isoserin B.

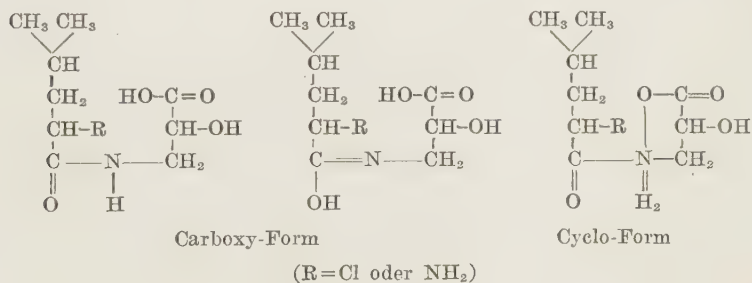




Nach Ausmessung der Diagramme von Leucyl-isoserin A und B können wir annehmen, dass die Verbindung A eine offene Kettenstruktur, die Verbindung B Betainform besitzt, weil die Längenausdehnung von der Verbindung A länger ist als die der Verbindung B.

Wie man aus Fig. 2. und 3. ersieht, sind die Diagramme der Röntgenographie des  $\alpha$ -Brom-isocapranyl-isoserins und die der offenen Form von Leucyl-isoserin sehr ähnlich. Man ersieht daraus erstens, dass der zuletzt ausgeschiedene, also leichter lösliche Bromkörper eine offene Kettenstruktur hat, zweitens, dass die röntgenographische Diagramme durch Verwechslung des Halogens mit Ammoniak nicht eine grosse Veränderung erfährt.

Unsere bisherigen Erfahrungen lehren uns, dass bei den  $\omega$ -Aminosäuren und Dipeptiden überzählige Isomeren durch Carboxy-cyclo-Desmotropie gebildet werden. Die Carboxy-cyclo-Desmotropie wird durch die Gegenwart eines fünfwertigen N-Atoms erklärt. Bekanntlich zeigt die Atomgruppe  $O=C-N-H$  leicht die Erscheinung der Tautomerie und der Stickstoff der umgewandelten Enolform ist bei der Anlagerung von zwei Wasserstoffatomen aus dem drei- in den fünfwertigen Zustand übergegangen.



#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Experimente von E. Fischer und F. Kölker, nach denen die beiden racemischen Leucyl-isoserine aus  $\alpha$ -Brom-isocapranyl-isoserin entstehen, wurden durch eine röntgenographische Untersuchung bestätigt.

2. Ein Beispiel der Carboxy-cyclo-Desmotropie der Amino-

säuren wird bei dem Leucyl-isoserin angefügt.

Dem Kultusministerium spreche ich für Beihilfen zur Ausführung dieser Untersuchung meinen ergebensten Dank aus.

#### LITERATUR.

Tomita, M. u. Sendju, Y. (1927): H-S **169**, 263.

Tomita, M. u. a. (1932): H-S **211**, 38.

Tomita, M. u. Seiki, Y. (1939): Jl. of Biochem., **30**, 107.

Tomita, M. u. Seiki, Y.: H-S im Jahrgang 1941, im Mei 1941 aufgenommen.

Fischer, E. u. Kölker, F. (1905): Liebigs Annalen **340**, 123.

## ÜBER DEN STOFFWECHSEL DES MIT CHAULMOOGRAÖL INJIZIERTEN TIERES.

### Über ihre Wirkung auf den Blutzucker des Kaninchens.

VON

RYOZI OZAWA.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1941)

Von jeher wird die Chaulmoograsäure, welche unter den Fettsäuren eine besondere chemische Struktur hat, als einziges Heilmittel gegen Lepra verwendet. Obgleich neben seiner speziellen Einwirkung auf die Leprabazillen auch Einflüsse auf den Menschenkörper denkbar sind, sind bisher jedoch keine Untersuchungen über solche Einflüsse veröffentlicht worden. Hierauf wurden die Veränderungen des Stoffwechsels bei den mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchen beobachtet. Ich glaube, dass somit der Behandlung der Lepra eine orientierende Aussicht gegeben werden könnte.

Um die mir zugewiesenen Untersuchungen über die Einflüsse der Injektion der Chaulmoograölemulsion auf den Zuckerstoffwechsel durchzuführen, habe ich mich zunächst mit der Beobachtung der Veränderung des Blutzuckerwertes befasst. Über den Umsatz der Fettstoffe bei den mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchen wurden zwei Resultate [Koyanagi (1940 a, b)] veröffentlicht.

#### EXPERIMENT.

Versuchsmethode: Die Emulsion des Chaulmoograöls besteht aus 5% Chaulmoograöl, 0,5% Protalbinauresnatrium und 5% Traubenzucker; sie wurde nach Koyanagi (1940) hergestellt. Als Versuchstiere wurden männliche Kaninchen von circa 2 kg. Körpergewicht gebraucht und täglich mit 250 g Tofukasu gefüttert.

Diese Fütterung wurde am Abend vor dem Versuchstage bis zum Ende des Versuchs eingestellt. Die Emulsion wurde ihnen pro kg. Körpergewicht je 2 ccm intravenös injiziert. Die Blutentnahme wurde in bestimmten Zeitabständen ausgeführt, der Blutzucker nach der Methode von Hagedorn und Jensen (1923) bestimmt.

#### A. Die vorbereitenden Versuche.

1) Die Kaninchen stiessen, in eine Zuchtkiste gesteckt, nur den Kopf hervor. In dieser Stellung erhielten sie die Injektion und dann nach Verlauf von 30–60 Minuten wurde ihnen Blut in bestimmten Zeitabständen entnommen. Es zeigte sich, dass diese Stellung während längerer Zeit auf den Blutzuckerwert nicht verändernd einwirkte: der anfängliche Wert von 107 mg/dl nahm allmählich ab, bis er 8 Stunden später auf 92 mg/dl absank. Also kann man die Einflüsse dieser Stellung wohl ausser acht lassen, weshalb die Blutentnahme bei den folgenden Versuchen immer in dieser Stellung vorgenommen wurde (Tabelle I).

TABELLE I.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl					
	vor Injektion	nach Injektion				
		$\frac{1}{2}$ St	1 St	2 St	4 St	8 St
7	108	109	98	90	96	92
8	108	105	101	100	93	90
9	106	99	106	100	97	94
Mittelwert	107	104	102	97	95	92

2) Das protalbinsaure Natrium, das zu 0,5% in die Emulsion eingemischt war, beeinflusste den Blutzuckerwert derartig, dass die Zahl 113 mg/dl vor der Injektion acht Stunden später auf 108 mg/dl fiel, wobei das Minimum 99 mg/dl, das Maximum 123 mg/dl betrug. (Tabelle II).

TABELLE II.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl					
	vor Injektion	nach Injektion				
		$\frac{1}{2}$ St	1 St	2 St	4 t	8 St
28	116	111	102	129	124	117
29	109	86	112	90	121	99
Mittelwert	113	99	111	110	123	108

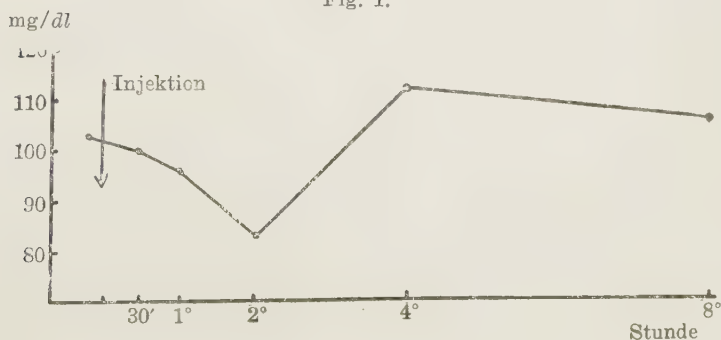
*B. Die Hauptversuche.*

a) Bei einmaliger Injektion der Chaulmoograöl-emulsion, welche aus 5% Chaulmoograöl, 0,5% protalbinsaurem Natrium und 5% Traubenzucker besteht, sank der Blutzuckerwert nach der Injektion allmählich ab, bis er zwei Stunden später das

TABELLE III.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl					
	vor Injektion	nach Injektion				
		$\frac{1}{2}$ St	1 St	2 St	4 St	8 St
4	103	99	97	85	117	110
6	99	92	92	75	105	115
24	107	105	94	86	111	102
26	104	102	100	85	115	98
Mittelwert	103	100	96	83	112	106

Fig. 1.



Minimum (83 mg/dl) erreichte, aber dann wieder emporzusteigen begann und vier Stunden später den höchsten Wert (112 mg/dl) erreichte. Endlich erhielt er acht Stunden später den früheren, normalen Wert wieder. (Tabelle III).

b) Bei einmaliger Injektion der Emulsion ohne Einmischung des Traubenzuckers erreichte der Blutzuckerwert eine Stunde nach der Injektion sein Minimum (87 mg/dl), dann, wieder höher steigend, erlangte er vier Stunden später das Maximum, die Rückkehr zum normalen Wert fand acht Stunden später statt. (Tabelle IV).

TABELLE IV.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl					
	vor Injektion	nach Injektion				
		$\frac{1}{2}$ St	1 St	2 St	4 St	8 St
11	104	92	90	99	98	105
12	105	98	86	93	118	95
13	95	94	87	95	110	91
Mittelwert	101	95	88	96	109	97

c) Bei fortdauernder zehn Tage lang ausgeführter Injektion der Chaulmoograölemulsion.

I) Bei täglich einmaliger Injektion wurde den Tieren täglich morgens um 7-8 Uhr Blut entnommen, um 10 Uhr die Emulsion injiziert und um Mittag Futter gegeben.

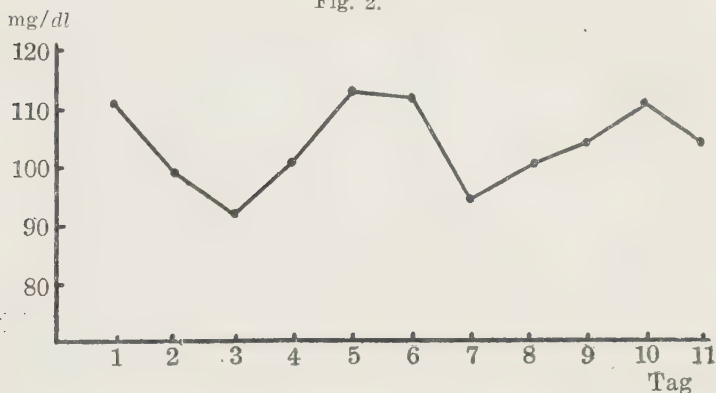
Vor der Injektion des ersten Tages betrug der Blutzuckerwert 110 mg/dl. Er veränderte sich danach zickzackartig, indem er am

TABELLE V.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl										
	1 Tag.	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "	11 "
14	105	100	97	98	109	116	94	108	99	102	90
15	115	97	87	103	117	108	93	92	109	120	117
Mittelwert	110	99	92	101	113	112	94	100	104	111	104



Fig. 2.



dritten Tage auf 92 mg/dl fiel und dann wieder aufsteigend am fünften Tage 113 mg/dl, am 7. Tage schon wieder 94 mg/dl, am 10. Tage 111 mg/dl und am 11. Tage 104 mg/dl, immer abwechselnd grösser oder kleiner wurde (Tabelle V).

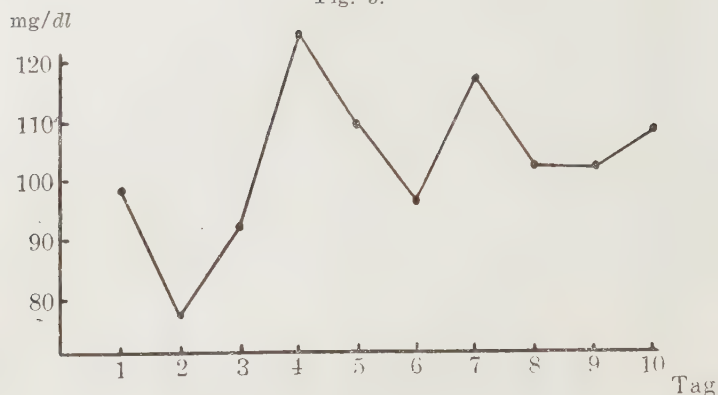
II) Bei täglich zweimaliger Injektion (Tabelle VI) wurde den Tieren täglich morgens um 7–8 Uhr Blut entnommen, morgens um 10 Uhr und nachmittags um 4 Uhr die Emulsion injiziert und um Mittag Futter gegeben.

Die wiederholte Ab- und Zunahme des Blutzuckerwertes wurde festgestellt, wie man aus den Zahlen: am ersten Tage vor der Injektion 98 mg/dl, am 2. Tage 77 mg/dl, am 4. Tage 125 mg/dl, am 6. Tage 96 mg/dl, am 7. Tage 117 mg/dl, am 8. Tage 102 mg/dl und am 10. Tage 102 mg/dl, ersehen kann.

TABELLE VI.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl									
	1 Tag.	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	8 "	10 "
16	96	63	108	117	112	100	125	104	120	106
17	99	91	76	133	105	92	109	100	84	110
Mittelwert	98	77	92	125	109	96	117	102	102	108

Fig. 3.



### C. Die Kontrollversuche.

Als Kontrolle der obigen Emulsion wurde nun eine Olivenöl-emulsion bestehend aus 5% Olivenöl, 0,5% protalbinsaurem Natrium und 5% Traubenzucker hergestellt.

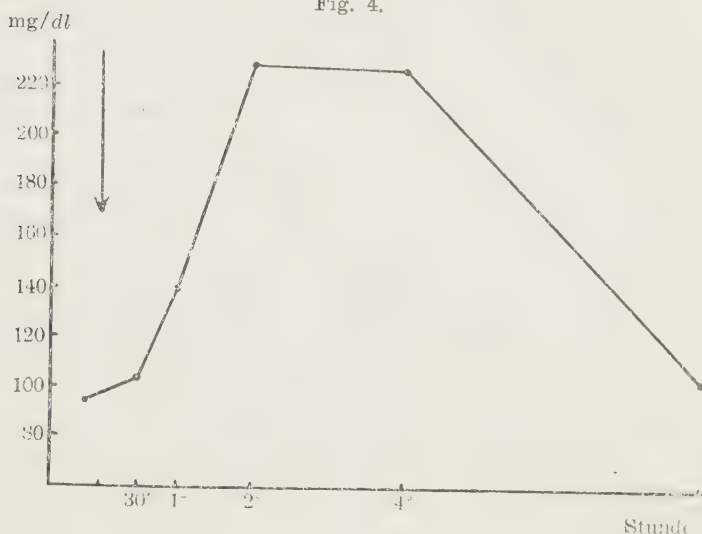
1) Bei einmaliger Injektion der Olivenölemulsion. Der Blutzuckerwert, der vor der Injektion 94 mg/dl war, vermehrte sich allmählich, zwei Stunden später 229 mg/dl, 4 Stunden später noch 227 mg/dl zeigend, und begann dann zu sinken, bis er acht Stunden später 104 mg/dl betrug, (Tabelle VII).

2) Bei täglich einmaliger, 10 Tage lang währender Injektion der Olivenölemulsion veränderte sich der Blutzuckerwert, der vor der Injektion am ersten Tage 102 mg/dl betrug, derartig, dass er am 3. 130 mg/dl, am 4. 109 mg/dl, am 5. 165 mg/dl, am 7. 90 mg/dl,

TABELLE VII.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl					
	vor Injektion	nach Injektion				
		½ St	1 St	2 St	4 St	8 St
21	93	101	128	229	170	108
26	95	105	149	228	303	99
Mittelwert	94	103	138	229	227	104

Fig. 4.



am 9. 129 mg/dl und am 10. 98 mg/dl betrug. (Tabelle VIII).

Bei den Gruppen, bei denen die Injektion den Tieren 15 Tage lang täglich einmal gegeben und Blut vom achten Tage ab entnommen wurde, stellte es sich heraus, dass sich der Blutzuckerwert je nach der Zeit abwechselnd verändert. 96 mg/dl, der Wert vor dem Beginn des Versuchs, steigerte sich am 8. Tage auf 145 mg/dl, am 9. Tage auf 234 mg/dl, welches das Maximum zeigte, aber am 10. Tage sank er auf 89 mg/dl, steigerte sich dann allmählich, um am letzten Tage wieder bis auf 80 mg/dl abzusinken (Tabelle IX).

TABELLE VIII.

Mittelwert Nr.	Blutzucker mg/dl									
	1 Tag.	2 "	3 "	4 "	5 "	6 "	7 "	8 "	9 "	10 "
18	111	109	127	111	153	129	89	138	127	101
19	93	113	133	107	177	103	91	111	130	95
Kaninchen	102	111	130	109	165	116	90	125	129	98

Fig. 5.

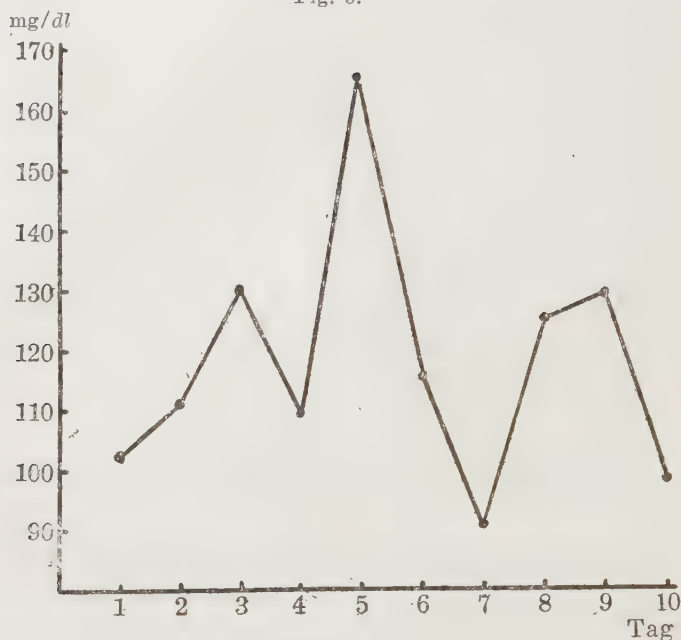


TABELLE IX.

Kaninchen Nr.	Blutzucker mg/dl							
	8 Tag.	9 "	10 "	11 "	12 "	13 "	14 "	15 "
31	129	234	97	166	92	113	94	76
32	161	233	81	167	142	124	110	84
Mittelwert	145	234	89	167	117	119	102	80

## ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

In den Fällen, bei denen die 5% Emulsion des Chaulmoograöls den Kaninchen pro kg. Körpergewicht nur einmal je 2ccm intravenös injiziert wird, wird beobachtet, dass der Blutzuckerwert unmittelbar nach der Injektion zu sinken beginnt und zwei Stunden später das Minimum erreicht, aber dann immer höher steigend, 4 Stunden später das Maximum erreicht, bis er endlich 8 Stunden später zum normalen Wert zurückgekehrt ist. Wenn die Injektion

fortgesetzt 10 Tage lang täglich einmal ausgeführt wird, so tritt zuerst eine Ab- und dann eine Zunahme des Blutzuckerwertes auf und etwa nach dreimaliger Wiederholung dieses Wechsels hören die Schwankungen nach und nach auf, endlich kehrt er gegen den zehnten Tag zum normalen Zustand zurück.

Dagegen ruft eine einmalige Injektion der Olivenölemulsion unmittelbar danach das Ansteigen des Blutzuckewertes hervor. Er erreicht 2–4 Stunden später das Maximum und kehrt 8 Stunden später zum Normalen zurück. Dabei achte man darauf, dass die Hyperglykämie hier viel stärker als bei Chaulmoograöl ist, und dass von der zeitweiligen Hypoglykämie, die direkt nach der Injektion des Chaulmoograöls auftritt, hier nie die Rede ist.

Wenn das Olivenöl 10 oder 15 Tage lang täglich einmal injiziert wird, wird der Blutzuckerwert am ersten oder zweiten Tage zuerst grösser und dann kleiner. Der höchste Wert ist am 10. Tage am deutlichsten zu beobachten, aber danach beginnt er zu sinken.

Nach Read (1924) ruft einmalige Injektion des Chaulmoograölmittels eine stärkere Ausscheidung von N im Harn hervor, die sich aber bei mehrmaliger Verwendung wegen der geschwächten Oxydierung des Gewebes und der Acidose vermindert. Dies hat leider keine unmittelbare Beziehung zu dieser Arbeit. Weitere Literatur war nicht aufzufinden.

Wenn man den Kaninchen die Emulsion des Chaulmoograöls einmal intravenös injiziert, beobachtet man danach eine Ab- und dann eine Zunahme des Blutzuckers, danach aber Rückkehr zum normalen Wert. Wenn die täglich einmalige Injektion zehn Tage lang fortgesetzt wird, tritt zuerst eine Ab- und dann eine Zunahme des Blutzuckers auf. Während dreimaliger Wiederholung dieses Wechsels werden die Unterschiede allmählich ausgeglichen, bis der Wert endlich etwa am 10 Tage zum Normalen zurückkehrt.

Diese Untersuchung wurde mittels finanzieller Unterstützung vom Japanischen Unterrichtsministerium für Wissenschaftliche Forschung ausgeführt.

## LITERATUR.

- Hagedorn u. Jensen (1923): Biochem. Z., **135**, 46. u. Biochem. Z.,  
**137**, 92.  
Koyanagi (1940): J. Biochem., **31**, 109. u. **32**, 317.  
Read (1924): J. Biolog. Chem., **62**, 541.



## ÜBER DEN STOFFWECHSEL DES MIT CHAULMOOGRAÖL INJIZIERTEN TIERES.

### Über ihre Wirkung auf die Menge der Fraktionen des Eiweisses im Blutplasma des Kaninchens.

VON

KOICHI KANAZAWA.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1941)

Das Chaulmoograöl ist seit alters her als spezifisches Heilmittel gegen die Lepra allgemein bekannt. Ausser der festgestellten Tatsache, dass seine Hauptbestandteile, Chaulmoograsäure und Hydnoearpussäure, in ihrer chemischen Struktur von anderen Fettsäuren verschieden sind und in der Therapie der Lepra seine besondere Wirksamkeit zeigen, liegt es wohl sehr nahe zu glauben, dass sie auch den Stoffwechsel des Menschenkörpers in ihrer eigenen Art beeinflussen könnten. Aber in dieser Hinsicht muss man leider darauf verzichten, Menschenkörper als Versuchsmaterial zu gebrauchen und sich mit den Untersuchungen an Tieren begnügen. Read (1924) berichtet schon, dass einmalige Injektion des Chaulmoograsäuren-Äthylesters eine Schmelzung des Gewebes und Acidosis hervorruft, was eine vermehrte Ausscheidung von N, Ca und S im Urin mit sich bringt, dass aber mehrmalige Anwendung dieser Injektion jedoch eine Verminderung der Ausscheidung solcher Substanzen verursacht. Auch nach Yoshinaga (1939) vermehrt sich die Ca-Menge im Urin des Kaninchens, wenn man ihm per cutan das Chaulmoograöl od. seine Derivate gibt. Sonst gibt es aber keine Literatur, in der man die Wirkung der intravenösen Injektion der Chaulmoograölemulsion auf den tierischen Eiweissumsatz behandelt. Da die Untersuchungen direkt an den Lepräsen nicht mit meinen Versuchen verglichen werden können, so sei hier nur zu ihrer Information ein Beispiel von

Schlossmann (1930) angeführt: nach ihm hat sich das Gesamteiweiss des Blutplasmas als 8,927 g/dl, das Albumin als 4,395 g/dl, das Globulin als 4,532 g/dl und das Rest-N. als 36 mg/dl herausgestellt.

Ich habe nun die Schwankung der Fraktionsmenge des Eiweisses im Blutplasma von Stunde zu Stunde, oder von Tag zu Tag beobachtet, um teilweise feststellen zu können, wie die intravenöse Injektion der Chaulmoograölemulsion bei Kaninchen mit dem Eiweissmusatz zusammenhängt.

#### EXPERIMENT.

Als Versuchstiere wurden gesunde männliche Kaninchen von ca. 2500 g Körpergewicht gebraucht. Sie wurden täglich mit Tofukasu (dem ausgepressten Rückstand bei Bohnengallertenerstellung) gefüttert. Nach Koyanagi (1940) wurde zunächst das Chaulmoograöl gereinigt und dann dessen 5%ige Emulsion hergestellt. Nachdem diese mit Glukose und protalbinsaurem Natrium im Verhältnis von 5% resp. 0,5% vermischt worden war, wurde sie den Tieren pro kg. 2 ccm injiziert. Übrigens gab man den Tieren am Morgen des Versuchs nichts zu essen und entnahm ihnen so im Hunger das Blut. Den als Kontrolle benutzten Tieren wurde in gleicher Weise eine 5-prozentige Olivenölemulsion (welche 5% Glukose und 0,5% protalbinsaures Natrium enthält) injiziert.

Der Versuch wurde an dem durch Herzpunktion entnommenen Zitratplasma angestellt. Die N-Bestimmung wurde nach der Kjeldahl Halbmikromethode, die Eiweisstrennung im Blutplasma nach Howe (1921), und die Enteiweissung nach Haden (1923) ausgeführt.

Die Bestimmung ist ungefähr folgende:

- 1) Die gesamte N-Menge: Es wurde mittels 0,25 ccm Blutplasma bestimmt. (G. N.)
- 2) Das Nichteiweiss-N: 0,5 ccm enteweisstes Blutplasmas wurde verwendet. (R. N.)
- 3) (Albumin + Nicht-Eiweiss)-N: In 0,5 ccm Blutplasma wurden 15 ccm der 22,2% Natriumsulfatlösung hineingetan, um

so das Globulin zur Fällung zu bringen, man erhält es nach Hinzufügung einer kleinen Menge Thymol drei Stunden lang auf  $37^{\circ}$ . Danach wurde mit trockenem Filtrierpapier filtriert. An 5,0 ccm Filtrat wurde die N-Menge bestimmt.  $[(Al + R) - N]$ .

4) (Albumin + Globulin + Nicht-Eiweiss)-N: Man vermischte 0,5 ccm Blutplasma mit 14 ccm der 0,8% Kochsalzlösung und, unter Schütteln, tropfte man 1 ccm der 2,5% Kalziumchloridlösung ein und tat schliesslich etwas Thymol hinein. Das so behandelte Blutplasma wurde dann 15 Minuten lang auf  $37^{\circ}$  erhalten, worauf die Filtration mit trockenem Filtrierpapier erfolgte. Die N-Bestimmung wurde an diesem Filtrat von 5,0 ccm vorgenommen.  $[(Al + Gl + R) - N]$ .

Nach den obigen Methoden wurde folgenderweise die Menge jeder Substanz erreicht:

Gesamt-N.	= G.N.
Nichteiweiss-N.	= R.N.
Fibrinogen-N.	= G.N. - (Al. + Gl. + R)N = F.N.
Albumin-N.	= (Al. + R.)N - R.N. = Al.N.
Globulin-N.	= G.N. - (Al. + R.)N - F.N. = Gl.N.

#### DIE VERSUCHSERGEBNISSE.

1) Die Menge je einer Fraktion des Plasma Eiweisses des gesunden Kaninchens bei der Blutentnahme durch die Herzpunktion. Tabelle I zeigt die durchschnittlichen Ergebnissen der zwei Fälle. Tabelle A zeigt ebenso die Schwankungen der Fraktionsmenge.

2) Die stündliche Veränderung der Fraktionsmenge des Blutplasma-Eiweisses bei einmaliger intravenöser Injektion der 5 prozentigen Chaulmoograölemulsion pro kg. 2 ccm.

Die Werte der N-Menge vor der Injektion und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden danach waren an 3 Tieren durchschnittlich folgende: (Tabelle I, Fig. 2).

Das Gesamt-N: Es nahm nach der Injektion nach und nach ab, um in 4 Stunden das Minimum zu erreichen. Danach nahm es aber

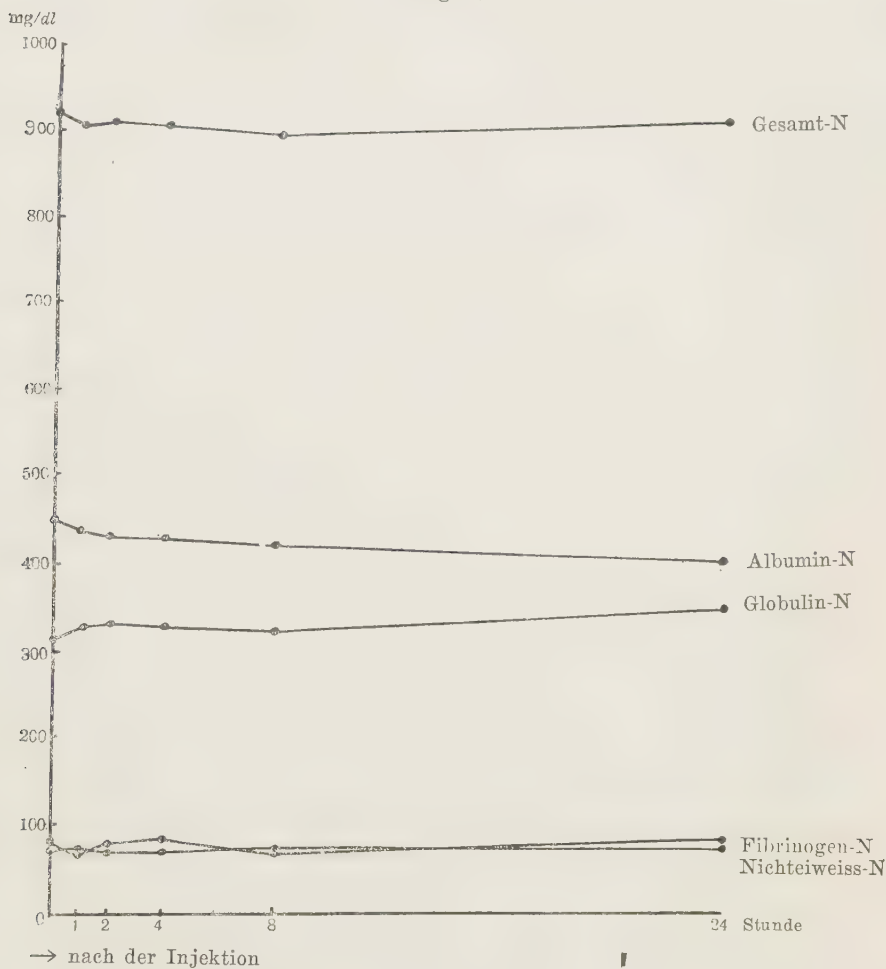
TABELLE I.

Stickstoff	vor Injektion	nach Injektion					
		1 St.	2 St.	4 St.	8 St.	24 St.	
Gesamt-	1	912,80	909,36	927,40	906,88	915,58	917,46
	2	928,35	898,76	891,43	912,17	872,35	915,91
	Mittel	920,57	904,06	909,41	905,52	893,96	916,68
Rest-	1	94,54	95,17	90,19	92,06	92,06	92,71
	2	57,24	46,66	46,06	47,91	57,86	58,00
	Mittel	75,89	70,91	68,12	69,98	74,96	75,35
Globulin-	1	294,99	302,46	341,51	306,29	356,63	356,24
	2	337,00	354,66	320,07	349,07	285,60	336,00
	Mittel	315,99	328,56	330,79	327,68	321,11	346,12
Albumin-	1	446,89	433,19	412,03	419,40	400,83	398,23
	2	450,49	440,54	448,63	437,42	439,87	403,60
	Mittel	448,69	436,86	430,31	428,41	420,35	400,91
Fibrinogen-	1	76,05	73,54	83,67	89,13	66,06	70,29
	2	84,62	56,90	76,70	77,77	79,08	92,71
	Mittel	80,33	67,72	80,18	83,45	72,54	81,50
Albumin- Globulin-		1,42	1,32	1,30	1,30	1,30	1,15

TABELLE A.

Stickstoff.	Max.	Min.	Differenz
Gesamt-	920,57	893,96	26,61
Nichteisweiss-	75,89	68,12	7,77
Globulin-	346,12	315,99	30,13
Albumin-	448,69	400,91	47,78
Fibrinogen-	83,45	67,72	15,73

Fig. 1.



allmählich zu und erlangte nach 24 Stunden so ziemlich denselben Wert wie vor der Injektion.

Das Nicht-Eiweiss-N: Es waren keine bedeutenden Veränderungen zu verzeichnen.

Das Globulin-N: Es nahm nach der Injektion allmählich ab und erreichte in 4 Stunden das Minimum. Aber nach 8 Stunden

hatte es das Maximum aufzuweisen, einen grösseren Wert als vor der Injektion. Dann nahm es wieder etwas ab und erlangte nach 24 Stunden ungefähr den gleichen Wert wie vor der Injektion.

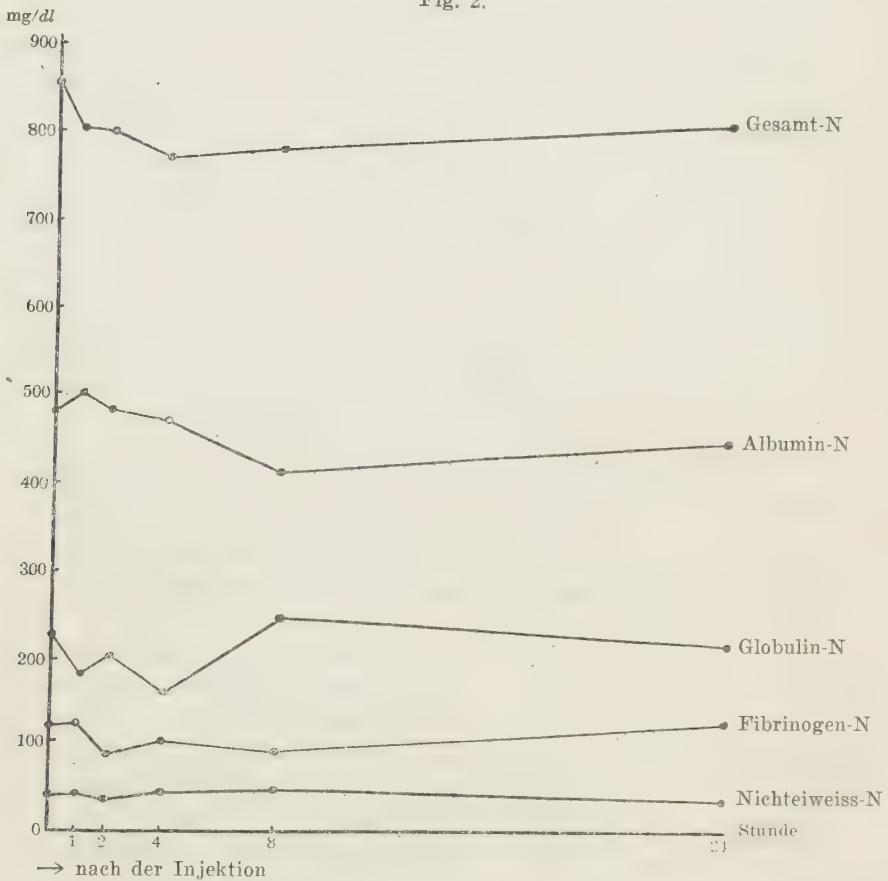
Das Albumin-N: Mit dem Albumin-N ist es im grossen und ganzen der umgekehrte Fall des Globulin-N. Es nahm nämlich nach der Injektion allmählich ab, bis es in 8 Stunden den kleinsten Wert hatte, aber nach 24 Stunden nahm es wieder zu und

TABELLE II.

Stickstoff	vor Injektion	nach Injektion					
		1 St.	2 St.	4 St.	8 St.	24 St.	
Gesamt-	1	788,97	816,35	739,20	735,46	744,17	801,42
	2	869,86	828,80	866,13	751,64	828,80	862,88
	3	905,95	866,13	795,20	825,06	784,00	792,71
	Mittel	854,93	837,09	800,18	770,72	785,66	817,00
Rest-	1	56,62	56,00	42,31	51,02	59,11	42,93
	2	37,33	38,57	47,91	48,53	51,64	43,55
	3	28,62	34,22	25,62	30,48	29,86	28,62
	Mittel	40,86	42,93	38,61	43,34	46,87	38,37
Globulin-	1	118,26	80,27	98,93	76,53	162,40	104,54
	2	207,20	160,53	156,80	102,00	188,53	212,80
	3	328,54	283,73	338,97	285,60	373,33	317,34
	Mittel	218,00	174,84	198,23	154,71	241,42	211,56
Albumin-	1	531,38	602,93	540,09	542,58	456,09	550,67
	2	457,33	457,96	530,75	420,00	457,96	456,98
	3	443,64	439,91	371,98	439,92	322,94	339,11
	Mittel	477,45	500,27	480,94	467,50	412,33	448,92
Fibrinogen-	1	82,71	77,15	57,87	65,33	66,57	103,28
	2	168,00	171,74	130,67	171,11	130,67	155,55
	3	105,00	108,27	58,63	69,06	57,86	107,64
	Mittel	118,62	119,05	82,39	101,83	85,04	122,16
Albumin- Globulin-	2,19	2,86	2,42	3,02	1,70	2,12	



Fig. 2.



kehrte zum Zustand vor der Injektion zurück.

Fibrinogen-N: Nach der Injektion neigte es etwas zur Abnahme, kehrte aber nach 24 Stunden zum Wert vor der Injektion zurück.

Ferner sind die Schwankungen der Fraktionsmenge jedes Eiweisstoffes im Blutplasma in Tabelle B angegeben.

3) Die stündliche Veränderung der Fraktionsmenge des Eiweisses im Blutplasma bei einmaliger intravenöser Injektion der 5% Olivenölemulsion pro kg. 2 cem.

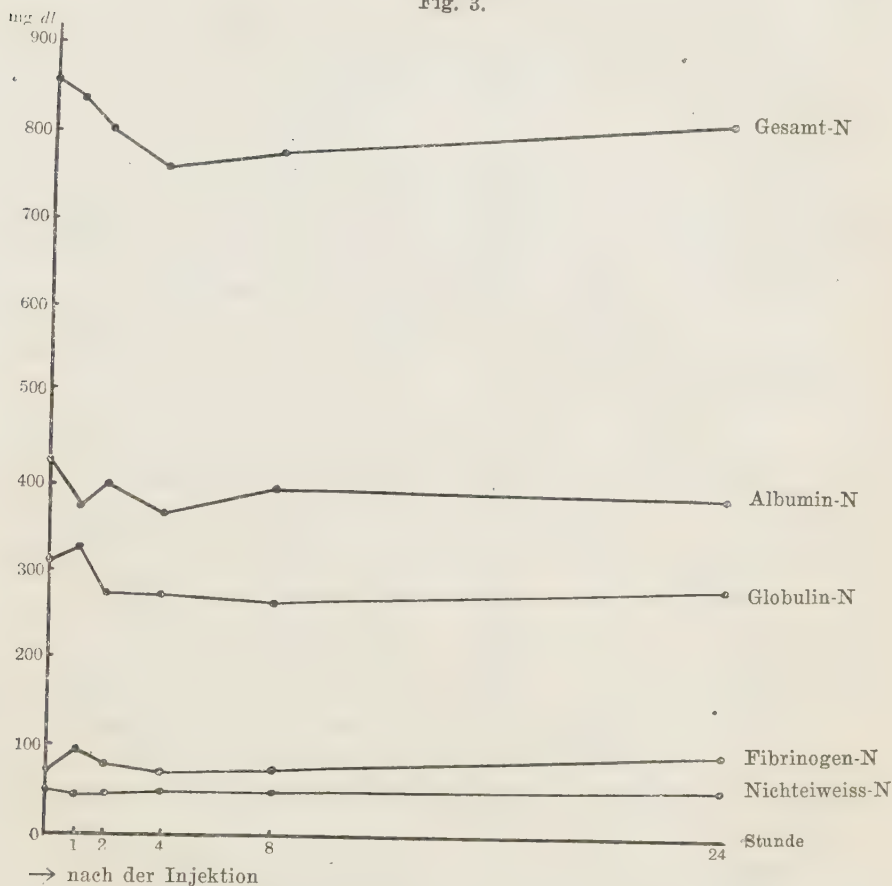
TABELLE B.

Stickstoff.	Max.	Min.	Differenz
Gesamt-	854,93	770,72	84,21
Nichteisweiss-	46,87	38,37	8,50
Globulin-	241,42	154,71	86,71
Albumin-	500,27	412,33	87,94
Fibrinogen-	122,16	82,39	39,77

TABELLE III.

Stickstoff	vor Injektion	nach Injektion					
		1 St.	2 St.	4 St.	8 St.	24 St.	
Gesamt-	1	812,75	790,22	749,15	719,28	734,22	787,73
	2	898,48	883,55	859,91	796,44	827,55	859,91
	Mittel	855,61	836,88	804,53	757,86	780,88	823,82
Rest-	1	55,37	45,42	46,04	47,28	42,31	49,77
	2	47,28	49,77	51,64	55,37	55,37	57,86
	Mittel	51,32	47,59	48,84	51,32	48,84	53,81
Globulin-	1	291,18	313,60	207,20	223,24	209,07	261,33
	2	336,67	343,46	345,34	321,07	311,74	309,87
	Mittel	316,92	328,53	276,27	272,15	260,40	285,60
Albumin-	1	366,51	357,78	373,96	350,32	359,02	351,56
	2	475,38	381,43	426,22	377,69	433,69	425,60
	Mittel	420,94	369,60	400,09	364,00	396,35	388,58
Fibrinogen-	1	99,69	73,42	121,95	98,44	123,82	125,07
	2	49,15	108,89	36,71	42,31	26,75	66,58
	Mittel	74,42	91,15	79,33	70,37	75,28	95,82
Albumin- Globulin-		1,32	1,12	1,44	1,33	1,52	1,36

Fig. 3.



Ich stellte diesen Versuch als Kontrolle an und gelangte zu den folgenden Ergebnissen. Die Tabelle III und Fig. 3 zeigen den durchschnittlichen Wert bei zwei Tieren.

Das GesamtN: Es nahm nach der Injektion nach und nach ab, um nach 4 Stunden das stärkste Herabsinken zu zeigen. Danach nahm es wohl wieder zu, aber auch nach 24 Stunden hatte es einen etwas kleineren Wert als vor der Injektion.

Das Nicht-Eiweiss-N: Eine Stunde nach der Injektion waren wohl einige Veränderungen zu konstatieren, die aber nunmehr 23

Stunden lang ziemlich konstant blieben.

Das Globulin-N: 2 Stunden nach der Injektion begann es abzunehmen, nahm nach 24 Stunden etwas zu, aber der Wert war etwas kleiner als vor der Injektion.

Das Albumin-N: es nahm auch nach der Injektion ab; nach 24 Stunden näherte es sich ungefähr dem Wert vor der Injektion.

Das Fibrinogen-N: Nach beträchtlicher Zunahme, die eine Stunde später eintrat, nahm es vorläufig ab, um dann der nochmaligen Zunahme zu weichen. 24 Stunden später zeigte sie sogar einen höheren Wert als vor der Injektion.

Die Tafel C zeigt die Schwankungen der Fraktionsmenge jedes Eiweisses im Blutplasma.

TABELLE C.

Stickstoff.	Max.	Min.	Differenz
Gesamt-	855,61	757,86	97,75
Nichteiweiss-	53,81	47,59	6,22
Globulin-	328,53	260,40	68,13
Albumin-	420,94	364,00	56,94
Fibrinogen-	95,82	70,37	25,45

4) Die Veränderungen der Fraktionsmenge des Eiweisses im Blutplasma der Tiere, denen die 5 protzentige Emulsion des Chaulmoograöls 10 Tage lange täglich einmal pro kg. 2 ccm injiziert wurde.

Die Durchschnittswerte bei zwei Tieren sind, wie sie in Tafel IV und Fig. 4 angegeben sind. Sie können folgendermassen zusammengefasst werden: nach der Injektion sank das Gesamt N im Vergleich mit demjenigen vor der Injektion von 886,66 mg/dl bis auf 838,13 mg/dl, also um 48,53 mg/dl herab; das Nichteiweiss-N sank mit dem Verlust der ungefähr halben Menge von 74,97 mg/dl auf 41,06 mg/dl ab; dagegen zeigte das Globulin-N eine kleine Zunahme, indem sie von 243,60 mg/dl auf 256,26 mg/dl stieg; bei dem Albumin N war die Abnahme von 473,82 mg/dl-437,73 mg/dl, bei der Fibrinogen-N-Menge eine geringe Zunahme von 94,26 mg/dl-103,60 mg/dl zu verzeichnen.

TABELLE IV.

Stickstoff	vor Injektion	nach Injektion
1	894,75	832,53
Gesamt- 2	878,57	843,73
Mittel	886,66	838,13
1	103,91	59,11
Rest- 2	46,04	23,02
Mittel	74,97	41,06
1	224,00	209,07
Globulin- 2	263,20	303,45
Mittel	243,60	256,26
1	469,15	482,22
Albumin- 2	478,49	393,24
Mittel	473,82	437,73
1	97,69	82,13
Fibrinogen- 2	90,84	125,07
Mittel	94,26	103,60
Albumin- Globulin-	1,94	1,70

Fig. 4.

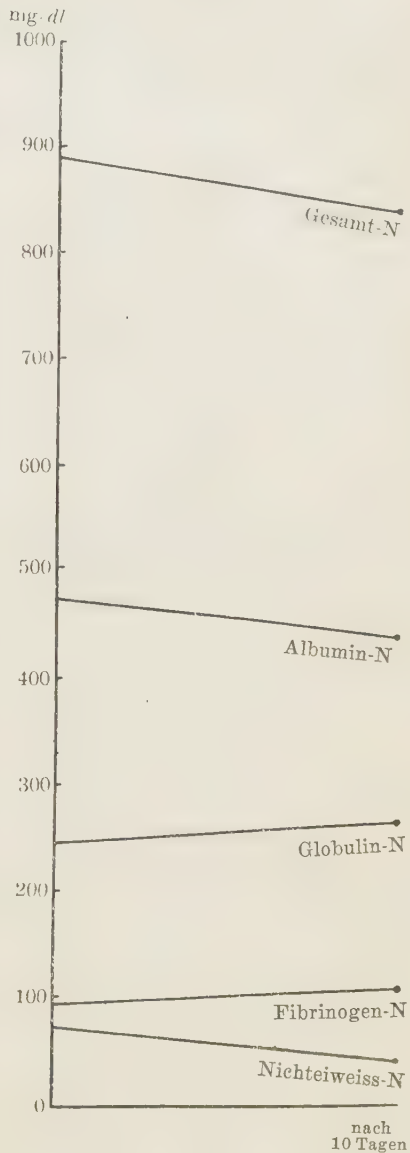


TABELLE V.

Stickstoff		vor Injektion	nach Injektion
Gesamt-	1	950,75	898,48
	2	908,33	858,66
	Mittel	929,54	878,55
Rest-	1	95,20	51,64
	2	48,53	29,86
	Mittel	71,86	40,75
Globulin-	1	211,93	294,83
	2	291,20	293,09
	Mittel	251,56	293,96
Albumin-	1	545,93	407,57
	2	434,93	478,71
	Mittel	490,43	443,19
Fibrinogen-	1	97,69	133,15
	2	133,67	116,60
	Mittel	115,68	124,87
Albumin- Globulin-		1,94	1,50

Fig. 5.

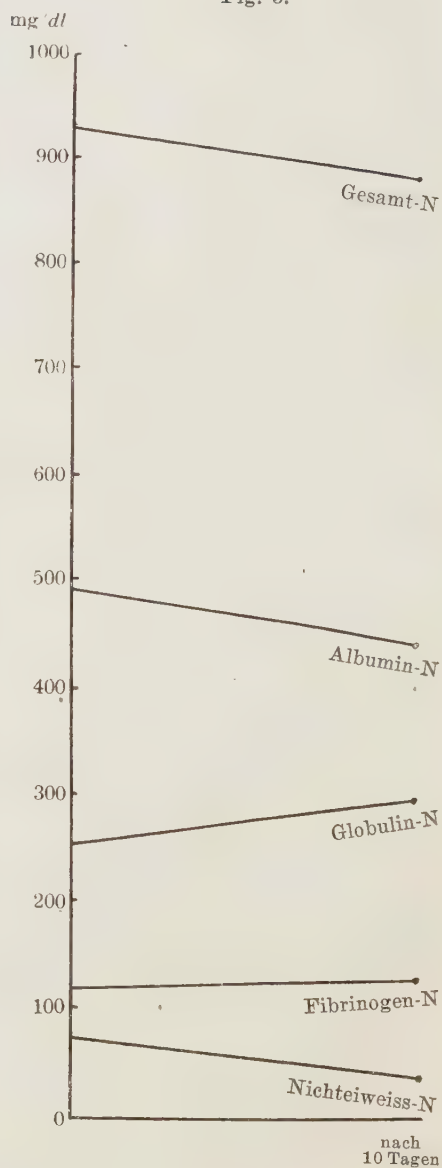
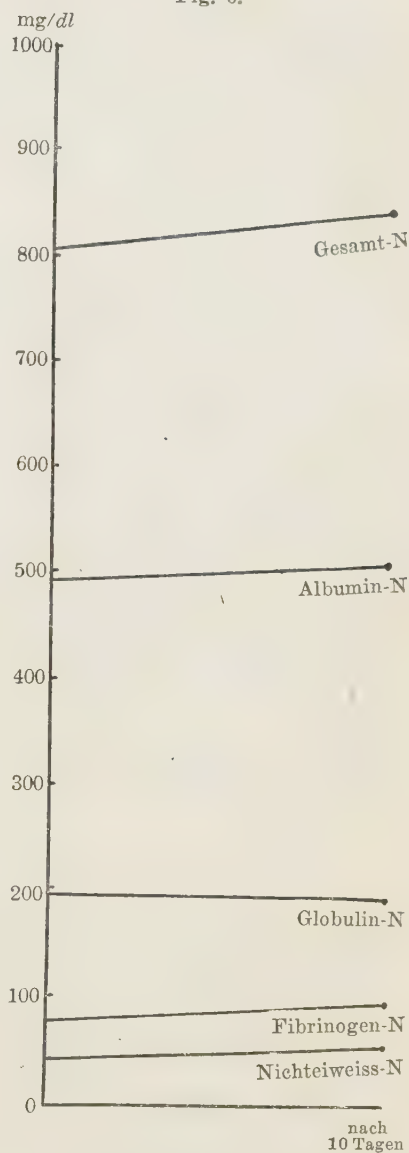




TABELLE VI.

Stickstoff		vor Injektion	nach Injektion
Gesamt-	1	811,37	811,37
	2	800,17	871,11
	Mittel	805,77	841,24
Rest-	1	43,55	51,69
	2	46,04	54,75
	Mittel	44,79	53,19
Globulin-	1	180,48	191,91
	2	209,07	188,53
	Mittel	194,77	190,22
Albumin-	1	536,98	493,78
	2	444,89	522,05
	Mittel	490,93	507,91
Fibrinogen-	1	55,37	74,04
	2	100,17	105,78
	Mittel	77,77	89,91
Albumin- Globulin-		2,52	2,67

Fig. 6.



5) Die Veränderung der Fraktionsmenge des Eiweisses im Blutplasma der Tiere, denen die 5% Emulsion des Chaulmoograöls 10 Tage lang täglich zweimal pro kg. 2 ccm injiziert wurde.

Die Resultate waren folgende: Kein besonders erheblicher Unterschied verglichen mit der obigen Gruppe, die mit der zehn Tage lang fortgesetzten, täglich einmaligen Injektion behandelt wurde. (Tabelle V, Fig. 5).

6) Die Veränderung der Fraktionsmenge des Eiweisses im Blutplasma der Tiere, denen die fünfprozentige Emulsion des Olivenöls 10 Tage lang täglich einmal pro kg. 2 ccm injiziert wurde.

Da aus den obigen Versuchen, in welchen die täglich ein- oder zweimalige Injektion der 5% Chaulmoograölemulsion ausgeführt wurde, kein besonderer Unterschied in Bezug auf die Schwankungen der Fraktionsmenge jedes Eiweissstoffs im Blutplasma hervorging, so wurde als Kontrollversuch die Injektion der 5% Olivenölemulsion vorgenommen, die täglich einmal zehn Tage lang fortgesetzt wurde. Die Durchschnittswerte, welche je an zwei Tieren festgestellt wurden, waren folgende. (Tabelle VI, Fig. 6). Das Gesamt-N stieg nach der Injektion im Wert von 805,77 mg/dl auf 841,24 mg/dl und das Nichteiweiss-N. von 44,79 mg/dl-53,19 mg/dl; dagegen sank das Globulin-N. von 194,77 mg/dl auf 190,22 mg/dl ab; bei dem Albumin-N. und Fibrinogen-N war eine kleine Zunahme von 490,93 mg/dl-507,91 mg/dl, resp 77,77 mg/dl-89,91 mg/dl zu verzeichnen.

#### SCHLUSS.

1. Das Gesamt-N. wird durch einmalige Injektion der Chaulmoograöl oder der Olivenölemulsion eine Weile abnehmen.

2. Das Nichteiweiss-N. nimmt bei der zehn Tage lang fortgesetzt verwendeten Injektion der Chaulmoograölemulsion beträchtlich ab, dagegen zeigt es bei der gleichen Verwendung der Olivenölemulsion vielmehr die Neigung zur Zunahme.

3. Das Globulin-N. nimmt bei einmaliger Injektion der Chaulmoograölemulsion zuerst ab und dann zu, indem es nach 24 Stunden den früheren, normalen Wert wieder erlangt. Dagegen zeigt es bei einmaliger Injektion der Olivenölemulsion zuerst eine

kleine Zunahme, aber darauf folgt bald die Abnahme, welche nach 24 St. nicht wiederhergestellt werden kann. Durch die zehn Tage lang fortgesetzte Injektion der Chaulmoograölemulsion wurde eine gewisse Zunahme, aber durch solche der Olivenölemulsion keine bedeutende Veränderung bewirkt.

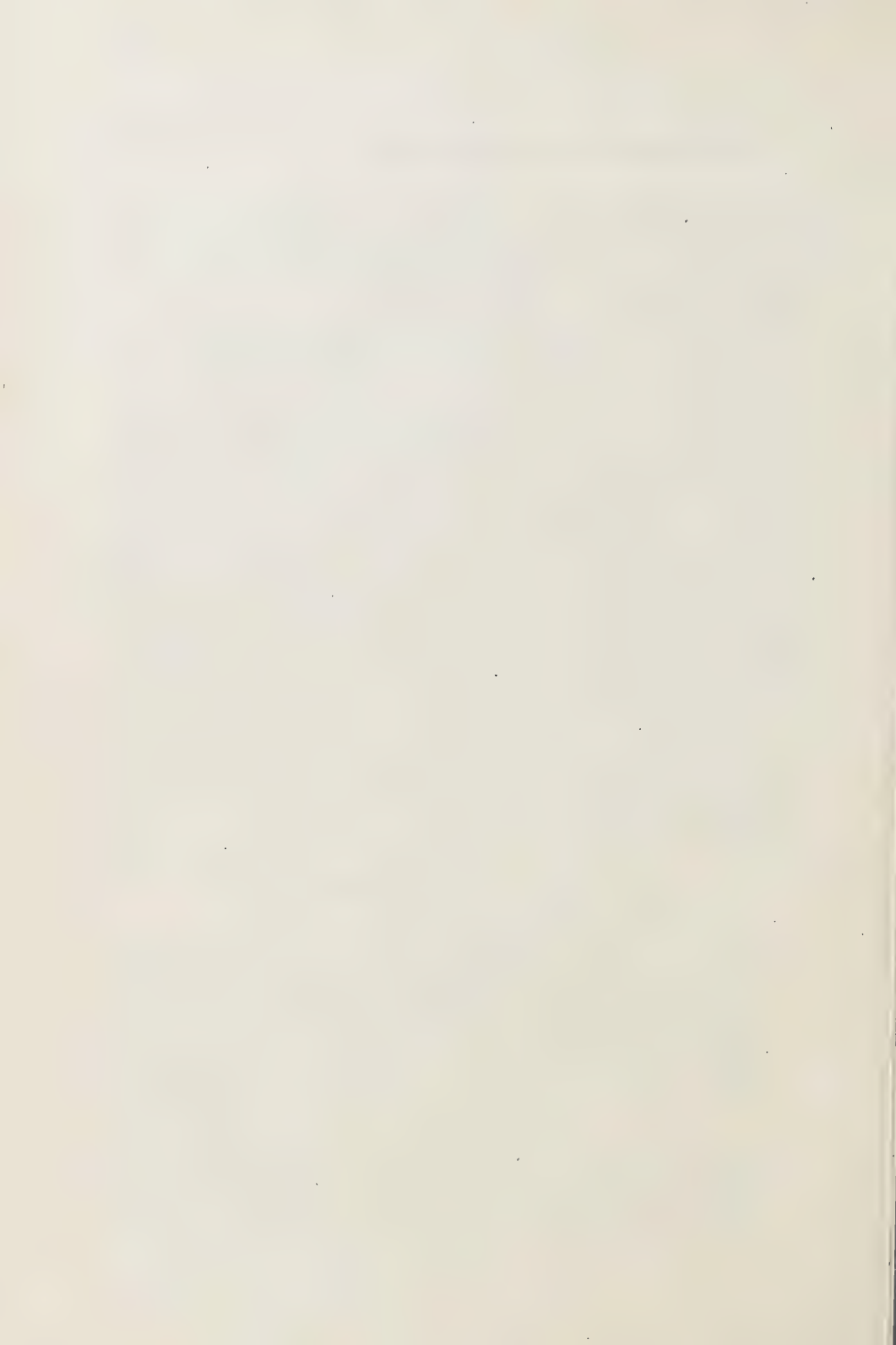
4. Das Albumin-N zeigt bei einmaliger Injektion des Chaulmoograöls zuerst eine Zu- und dann eine Abnahme, welche 24 St. später noch nicht ganz wiederhergestellt werden kann. Die einmalige Injektion des Olivenöls führt am Anfang eine Abnahme herbei, welche in 24 St. nicht ganz eingeholt werden kann. Zehn Tage lang fortgesetzt injiziert, führt das Chaulmoograöl zur Abnahme, dagegen das Olivenöl zur Zunahme.

5. Das Fibrinogen-N nimmt nach der einmaligen Verwendung der Chaulmoograöl- oder der Olivenölemulsion gleichfalls eine Weile etwas zu und dann ab, um der nochmaligen Zunahme, die bis zum Wiedererlangen des früheren normalen Wertes führt, zu weichen. Die 10 Tage lang fortgesetzte Injektion des einen oder des anderen Öls bringt nur eine kleine Zunahme mit sich.

Diese Untersuchung wurde mittels finanzieller Unterstützung vom Japanischen Unterrichtsministerium für wissenschaftliche Forschung ausgeführt.

#### LITERATUR.

- Cullen and Van Slyke (1920): J. Biol. Chem., **41**, 587.  
 Haden (1923): J. Biol. Chem., **56**, 469.  
 Howe (1921): J. Biol. Chem., **49**, 109.  
 Koyanagi (1940): J. Biochem., **31**, 109.  
 Read (1924): J. Biol. Chem., **62**, 541.  
 Schlossmann (1930): Z. Immunforsch., **68**, 154.  
 Yoshinaga (1939): Lepro, **10**, 547.



## ÜBER DEN STOFFWECHSEL BEI NIEDRIGER TEMPERATUR.

### 1. Mitteilung: Über den Zusammenhang zwischen niedriger Temperatur und dem Serumkephalin.

VON

MASAHARU AMANO.

(Aus dem Biochem. Institut der Kumamoto Med. Fakultät.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1942)

Es sollte erforscht werden, wie strenge Kälte mit dem Stoffwechsel zusammenhängt, zunächst besonders, wie sie die Kephalinmenge des Serums beeinflussen kann, unter Berücksichtigung der Mitteilung von Yoshida (1940), dass der Kephalingehalt im Blutplasma im Winter geringer als im Sommer sei. Dabei wurde der Vergleichung halber auch die Bestimmung von Nicht-Eiweiss-N. und Gesamt-N. ausgeführt.

#### DER VERSUCH.

Die Methode: Zur Erhaltung einer beständigen Kälte wurde ein elektrischer Thermostat für die Kälte, Fabrikat von Shimazu, benutzt und die Menge von Lipoid-NH<sub>2</sub>-N im Serum des Kaninchens je bei  $-10^{\circ}$ ,  $-20^{\circ}$  und  $-30^{\circ}$  gemessen und so die Veränderungen des Kephalins betrachtet.

Als Versuchstier wurden gesunde, weisse männliche Kaninchen etwa von 2,5 kg. Körpergewicht, die eine bestimmte Zeit mit Tofukasu (Rückstand der Bohnengallerte) gefüttert worden waren, verwendet. Nachdem ihnen in nüchternem Zustand aus der Ohrvene 10 ccm. Blut entnommen war, wurden sie in den Thermostat gelegt, dessen innere Temperatur je nach dem Zweck des Versuchs reguliert war, und so drei Stunden lang gelassen. Danach wurden sie wieder herausgenommen und ihnen noch einmal in gleicher Weise Blut entnommen.

Die Bestimmung des Lipoid-NH<sub>2</sub>-N: Nach der Methode Takatas (1936) wurde zuerst 1,0 ccm. Serum in den Meyer-Kolben der Kapazität von 100 ccm, der 20 ccm der Mischung von Äther und Alkohol (1:1) enthielt, hineintropfend und schüttelnd zur Genüge gemischt. Die somit erworbene Flüssigkeit wurde dann im Wasserbad von 60–70° schwach gekocht und danach bei gewöhnlicher Zimmertemperatur zur Kühlung liegen gelassen. Ihr Filtrat, das durch die Filtration in den Kjeldahl-Kolben erhalten worden ist, wurde bei niedriger Temperatur und niedrigem Druck verdampft. Dann wurde dem dabei zurückgebliebenen Bodensatz eine kleine Menge von wasserfreiem Äther beigemengt und nach hinreichendem Rühren mit einem Glasstäbchen durch ein Asbesttrichter filtriert. Der Bodensatz, der noch am Trichter haftete, wurde wieder mit einigem Äther abgespült und auch diese Flüssigkeit filtriert. Dieses Verfahren wurde mehrere Male wiederholt, und alles Filtrat vollständig in einem Kolben gesammelt. Der Äther wurde bei 50°C abgedampft und der zurückgebliebenen Bodensatz in wasserfreiem Alkohol im Wasserbad von 80°–90° aufgelöst. In diese Flüssigkeit wurden 2 ccm erhitztes Wasser eingetropft und genügend geschüttelt, bis die so entstandene Emulsion durch fortdauernde Abdampfung quantitativ 1,0 ccm betrug.

An dieser Emulsion wurde endlich mittels des Mikrobestimmungsapparats für Amino-N [Nakashima, (1932)] Lipoid-NH<sub>2</sub>-N bestimmt.

Das Nichteisweiß-N. und das Gesamt-N: Diese wurde nach der Bangschen bzw. der Mikrokjeldahlschen Methode bestimmt.

#### DIE ERGEBNISSE.

Bei Zimmertemperatur: Das Lipoid-NH<sub>2</sub>-N im Blutserum beträgt 1,35 mg/dl, welches drei Stunden später bis zu 1,272 mg/dl absinkt. Das Verhältnis zwischen beiden Werten ist also 1:0,95, was keinen bedeutenden Unterschied darstellt.

Bei der Temperatur von –10°C: Während das Lipoid-NH<sub>2</sub>-N im Serum 1,652 mg/dl beträgt, sinkt es, wenn das Kaninchen bei –10°C drei Stunden lang gelegen hat, auf 1,041 mg/dl ab. Das



Verhältnis zwischen beiden Werten ist 1:0,63; es lässt sich eine Verminderung des Kephalingehaltes bemerken.

Bei der Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$ : Die Menge des Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$  ist bei Zimmertemperatur 1,102 mg/dl, während sie nach Liegenbleiben im Thermostat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf 0,661 mg/dl absinkt; das Verhältnis ist 1:0,60.

Bei der Temperatur von  $-30^{\circ}\text{C}$ : Die Menge des Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$  ist bei Zimmertemperatur 1,215 mg/dl, nach Liegenbleiben im Thermostat bei  $-30^{\circ}\text{C}$  0,243 mg/dl. Das Verhältnis zwischen beiden Werten ist also 1:0,2.

TABELLE I.

Kaninchen Nr.	Temperatur	Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$ (mg/dl)		
		vor Versuch	3 St. nach Liegen	Verhältnis
1	Zimmer Temp. ( $24^{\circ}\text{C}$ )	1,350	1,272	1:0,95
2	$-10^{\circ}\text{C}$	1,653	1,041	1:0,63
3	$-20^{\circ}\text{C}$	1,102	0,661	1:0,60
4	$-30^{\circ}\text{C}$	1,215	0,243	1:0,20

Nicht-Eiweiss-N: Dieses ist bei der Zimmertemperatur 77,3 mg/dl, aber es wird auf 93,3 mg/dl erhöht, wenn das Kaninchen bei derselben Temperatur drei Stunden lang liegen bleibt. Wenn man es bei  $-10^{\circ}\text{C}$  drei Stunden lang liegen lässt, beträgt die Menge des Nicht-Eiweiss-N. 238 mg/dl, welche Zahl das 3,5 fache von 68 mg/dl, der Menge bei Zimmertemperatur. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist die Menge nach dreistündigem Liegenbleiben des Kaninchens 181,02 mg/dl, also verglichen mit 70,25 mg/dl, dem Wert bei Zimmertemperatur, ums 2,6 fache vermehrt. Aber bei  $-30^{\circ}\text{C}$  beträgt sie 78 mg/dl; das ist keine grosse Abweichung vom normalen Wert 82 mg/dl.

Was nun das Gesamt-N. anbelangt, so ist seine Menge bei Zimmertemperatur 873 mg/dl, aber sie beträgt drei Stunden später 942 mg/dl. Bei  $-10^{\circ}\text{C}$  wird sie nach dreistündigem Liegenbleiben 933 mg/dl, während sie bei Zimmertemperatur 885 mg/dl beträgt.

Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist der Wert  $882\text{ mg/dl}$ , nach Liegenbleiben 1,2 mal so gross wie die Zahl  $737\text{ mg/dl}$  bei Zimmertemperatur. Wenn dieses Gesamt-N. bei  $-30^{\circ}\text{C}$  drei Stunden lang liegen bleibt, so ist seine Menge  $748\text{ mg/dl}$ , was nur eine kleine Verminderung darstellt, denn sie hat bei Zimmertemperatur  $771\text{ mg/dl}$  aufzuweisen.

TABELLE II.

Kaninchen Nr.	Temperatur	Nicht-Eiweiss-N (mg/dl)			Gesamt-N (mg/dl)		
		vor Versuch	3 St. nach Liegen	Ver- hältnis	vor Versuch	3 St. nach Liegen	Ver- hältnis
1	Zimmer Temp. ( $24^{\circ}\text{C}$ )	77,3	93,3	1:1,2	873	942	1:1,07
2	$-10^{\circ}\text{C}$	68,0	238,0	1:3,5	885	933	1:1,05
3	$-20^{\circ}\text{C}$	70,25	181,02	1:2,6	737	882	1:1,2
4	$-30^{\circ}\text{C}$	82,0	78,2	1:0,95	771	748	1:0,97

Es soll hier hinzugefügt werden, dass die Prüfung der Körpertemperatur direkt nach dem Herausnehmen aus dem kalten Apparat überall ein Sinken bestätigt hat, denn bei den Kaninchen, deren normale Körpertemperatur  $37,5^{\circ}$  war, sank diese bei  $-10^{\circ}$  auf  $35^{\circ}$ , bei den anderen, deren normale Körpertemperatur  $37,8^{\circ}$  war, bei  $-20^{\circ}$  auf  $33^{\circ}$ , und wenn das Kaninchen der normalen Körpertemperatur von  $37,3^{\circ}$  bei  $-30^{\circ}$  lag, sank sie auf  $28,5^{\circ}$ , also sehr stark ab.

## SCHLUSS.

*Bei niedriger Temperatur:*

1. Die Kephalinmenge des Serums nimmt umso mehr ab, je mehr die Temperatur absinkt.
2. Das Nicht-Eiweiss-N. zeigt bei  $-10^{\circ}\text{C}$  seinen höchsten Wert und wird bei  $-30^{\circ}\text{C}$  zum Wert der normalen Temperatur zurückversetzt.
3. Das Gesamt-N. zeigt sowohl bei gewöhnlicher wie auch bei niedriger Temperatur keinen sehr bedeutenden Unterschied.

Diese Untersuchung wurde mittels finanzieller Unterstützung vom Japanischen Unterrichtsministerium für wissenschaftliche Forschung ausgeführt.

LITERATUR.

Nakashima (1932): J. of Juzen Med. Soc., **37**, 2176.

Takata (1936): J. Biochem., **24**, 153.

Yosida (1940): J. Biochem., **31**, 243.



Other than those which are not in the list of the

following: The following are the names of the persons who have been

admitted to the office of the Secretary of the State of New York

for the purpose of receiving the same, and the names of the persons

who have been admitted to the office of the Secretary of the State of New York

for the purpose of receiving the same, and the names of the persons

who have been admitted to the office of the Secretary of the State of New York

for the purpose of receiving the same, and the names of the persons

who have been admitted to the office of the Secretary of the State of New York

for the purpose of receiving the same, and the names of the persons